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

Автореферат

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научен ръководител

Доц. Д-р Доброслав Кюркчиев, дмн

Официални рецензенти:

Проф. Спаска Станилова, дбн

Доц. Милена Иванова-Шиварова, дб

Докторска програма „Имунология”

София, 2016 г.

Дисертационният труд съдържа 189 стандартни печатни страници и е онагледен с 33 фигури и 6 таблици. Използвани са 444 литературни източника, от които 2 на кирилица и 442 на латиница.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 5 публикации и 9 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на научен съвет към Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология , МФ, Медицински Университет – София на 29.02.2016 г. и е насочен към официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

Проф. Спаска Ангелова Станилова, дн

Доц. Милена Иванова Иванова-Шиварова, дм

Становища:

Доц. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн (научен ръководител)

Доц. Милена Сергеева Мурджева, дб

Проф. д-р. Севдалин Славов Начев, дмн

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 18.05.2016 г. от 13:30 ч. в аулата на УМБАЛ „Св. Иван Рилски", бул. „Акад. Ив. Ев. Гешов" №15.

Съдържание:

Съдържание: **- 3 -**

Списък на по-често използваните съкращения: **- 4 -**

Въведение **- 6 -**

Цел и задачи **- 8 -**

Материали и методи **- 9 -**

Резултати и обсъждане **- 11 -**

1. ***Имуфенотипизиране на имунни клетки, инфилтриращи ГБМ*** - 11 -
2. ***Експресия на Stat3 от ГБМ*** - 19 -
3. ***Резултати получени при клетъчно култивиране на клетки, изолирани от ГБМ*** - 21 -
4. ***Експресия на маркери, характерни за ТСК и НСК, от клетъчни култури от ГБМ*** - 26 -
5. ***Потенциал за самообновление на ГБМ клетъчни култури*** - 33 -
6. ***Експресия на Stat1 в клетъчни култури от ГБМ*** - 35 -
7. ***Експресия на маркери, характерни за МСК от клетъчни култури от ГБМ*** - 37 -
8. ***Остеогенна и адипогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ*** - 38 -
9. ***Секреция на цитокини при ГБМ клетъчни култури.*** - 42 -
10. ***Изследване на влиянието на супернатанта от ГБМ клетъчни култури върху активацията на PBMCs*** - 45 -
11. ***PIBF експресия в клетъчни култури от ГБМ*** - 50 -
12. ***Култивирани по наш модел клетки, изолирани от ГБМ – ТСК или МСК?*** - 53 -

Заключение **- 60 -**

Изводи: **- 63 -**

Приноси: **- 64 -**

Публикации във връзка с дисертационния труд **- 65 -**

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

CD – cluster of differentiation

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

IDO - indoleamine-2 3-dioxygenase

IL – interleukin

MDSCs - myeloid derived suppressor cells

MMP – matrix metaloproteinase

NKG2DL – NKG2D ligand

PBMC – peripheral blood mononuclear cells

PD-L 1,2 – programmed death-ligand 1,2

PDGF – plateled-derived growth factor

PDGFR – plateled-derived growth factor receptor

PGE2 – prostaglandin E2

PHA - phytohemagglutinin

PIBF – progesterone induced blocking factor

Sox-2 – sex determining region Y-box 2

Stat – signal transducer and activator of transcription

TGFβ – Tissue growth factor β

Tregs - регулаторни Т-лимфоцити

VEGF – Vascular endothelial growth factor

VEGFR - Vascular endothelial growth factor receptor

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 данни на Клиника по неврохирургия, УМБАЛ "Св. Иван Рилски".

В нервната система 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 имунен отговор, като в микросредата на глиобластома мултиформе са открити множество клетки, индуциращи имунен 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).Секреция на цитокини и други имуносупресивни фактори като interleukin-6 (IL-6), IL-10, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor-β (TGF-β) и др, както и експресия на имуносупресивни молекули като indoleamine-pyrrole 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 предизвикват наблюдаваната имунна супресия, или съществува първична имуносупресия, която благоприятства по-нататъшното развитие на тумора.

Дисертационният ми труд, изготвен с помощта и в сътрудничество с Клиника по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски", Лаборатория по клинична патология и невропатология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски", Секция по молекулярна имунология, ИБИР, БАН и Тъканна банка „БулГен" включва изследване на инфилтрацията на периферия и център 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 й върху периферни кръвни мононуклеарни клетки на здрави хора (PBMC).

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.

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 чрез секреторни фактори да потискат 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.

Материали и методи

Бяха изследвани общо 194 пациента с хистологично доказана диагноза ГБМ и 8 здрави лица.Хистологичната диагноза беше поставена в Лаборатория по клинична патология и невропатология „Проф. Сашо Божинов“ към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, 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 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 хистологичните материали надвишава този на пациентите, тъй като при някои пациенти са проведени 2 или 3 операции.

За клетъчно култивиране и имунофенотипизиране бяха използвани материали от 28 пациента (16 мъже и 12 жени), на възраст от 42 до 74 години, които ни бяха предоставени от Клиниката по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ София.

Резултатите от фенотипизиране на имунни клетки, инфилтриращи ГБМ, бяха получени въз основа на изследването на материали от 12 пациента.

Клетъчно култивиране беше приложено при 16 материала от пациенти с диагноза ГБМ.

Изследването на материалите, изолирани от пациенти с диагноза ГБМ беше извършено чрез следните методи:

- Флоуцитометричен анализ;
- Имунохистохимия;
- Клетъчно култивиране;
- Имуноцитохимия и конфокална микроскопия;
- qRT-PCR;
- Тестове за клоногенност;
- ELISA;

- Тестове за остеогенна диференциация;
- Тестове за адипогенна диференциация;
- Тест за митогенна активация на Т-лимфоцити;
- Статистически методи.

Резултати и обсъждане

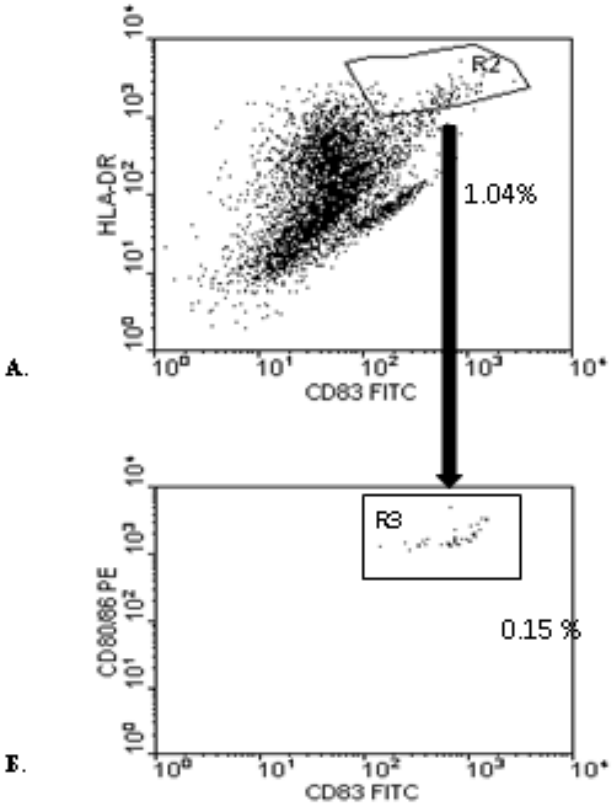
1. Имуфенотипизиране на имунни клетки, инфилтриращи ГБМ

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 ко-стимулаторни молекули, което води до толерогенен имунен отговор, поради настъпила анергия при Т клетките.

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.1), 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.1 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 B7 (CD80, CD86) от АПК в R2 областта, беше определен като те бяха представени на друг плот и „хванати“ в област R3 (Фиг.1 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 Фиг. 1 е показана представителна графика от описаните експерименти.

Липсата на B7 предполага, че АПК са не само неспособни да активират ефективен имунен отговор, а дори обратно те явно са клетки индуциращи имунен толеранс.



Фиг. 1 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. От двойноположителните клетки 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 IFNγ и 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) установени по маркери $CD11b^{+}CD11c^{+}CD45^{+}$ и на ДК (средно 0.08%) съответно по маркери CD1c, CD11c и BDCA-2^{-}. Подобно на нашите резултати те отчитат, че процентът клетки експресиращи костимулаторни молекули от ГБМ инфилтриращата микроглия е много нисък (1-2%).

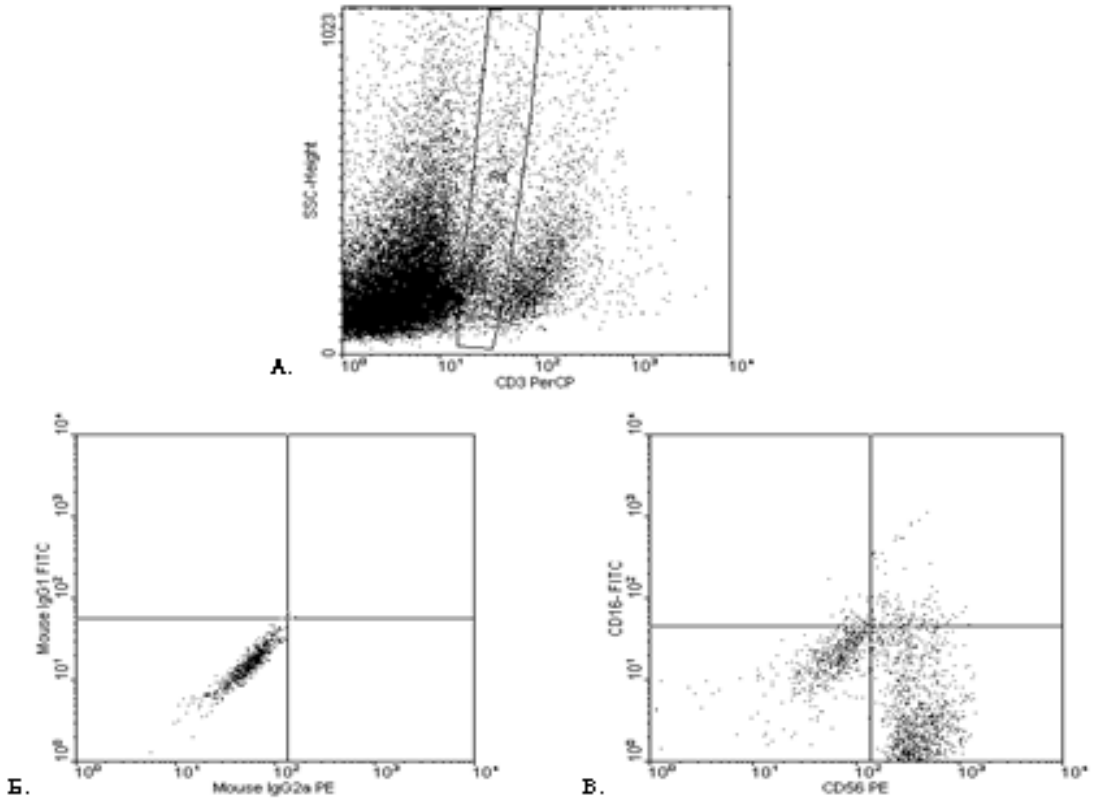
Както беше споменато малигнените образувания като ГБМ много често използват функциите на АПК, за да избегнат ефективен имунен отговор и за да променят реализираният такъв към толерогенен. (*Van Duivenvoorde et al. 2006).* АПК са способни да предотвратят, инхибират и модулират Т-клетъчният ефекторен имунен отговор, използвайки различни механизми. Един от механизмите, използван от туморите за постигане на тази цел е потискането на експресията на ко-стимулаторни молекули като B7 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 *(Abeand 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 B7 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 секретиран от туморните клетки може директно да действа върху ДК, супресирайки продукцията им на TNFα, IFNγ и IL-12 и по този начин насочва клетките към толерогенен фенотип, характеризиращ се с липса на B7 експресия. TGF-β секретиран от туморните клетки, от своя страна, води до намаляване на експресията на MHC 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)*

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 MHC молекули. Много често, за да избегнат действието на цитотоксичните Т-лимфоцити, вирус инфектираните и туморните клетки намаляват експресията си на MHC 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. 2 А), като след това в нов плот бяха отчетени само двойно-позитивните за CD16 и CD56 (Фиг. 2 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. 2 Б. са представени контролни клетки, маркирани с антитяло от същия изотип, но без специфичност за CD16 и CD56 (изотипна контрола), а на Фиг. 2 В – специфичното оцветяване на установените двойно-положителни по тези маркери клетки.

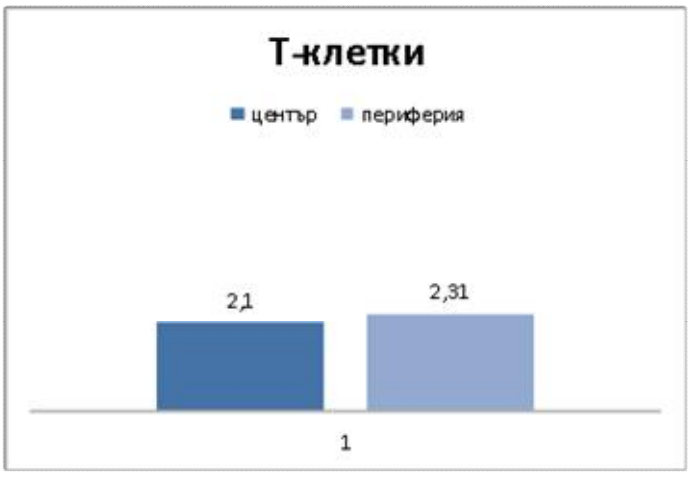


Фиг. 2 Флоуцитометрична платформа за определяне на NK-клетки инфилтриращи ГБМ.
А. В прозореца са представени клетките от цялата туморна маса, като в R1 са „хванати“ клетките негативни за CD3. Б. Изотипна контрола. В. В прозореца са представени клетките, хванати в R1, като в горния десен квадрат представя клетките двойноположителни за CD16 и CD56.

Други автори при изследване на инфилтрацията на глиобластоми с NK-клетки получават подобни на нашите резултати – *Levy et al. 2011* посочват, че NK-клетките представляват 2,11% от всички инфилтриращи ГБМ имунни клетки. Нашите резултати описват само наличието на NK клетки инфилтриращи ГБМ, но не дават информация за функционалното им състояние. Според литературните данни NK 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 NK 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*

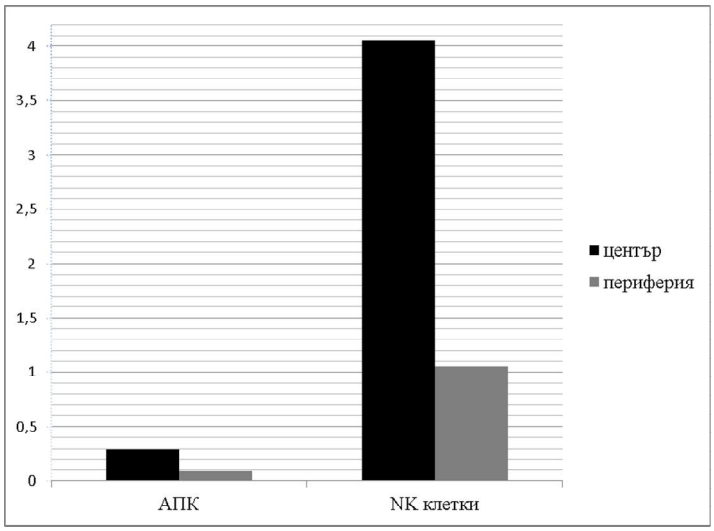
al.) Най-нови изследвания сочат, също че ДК и NK-клетките активно си взаимодействат, като се счита, че зрелите ДК могат да активират NK-клетките. *(Degli-Esposti M. and Smyth M. 2005)*. Поддържането на АПК в туморната микросреда в незрял, толерогенен фенотип би могло да допринесе за невъзможността на NK клетките да се активират. В туморното обкръжение е установена и популация от myeloid derived suppressor cells (MDSCs), която активно се привлича от ГБМ и за която се счита, че може ефективно да подтисне NK-клетъчната активация. Това се случва при директен контакт между клетките (MDSCs и NK), при което се инхибира IL-2-медиираната активация на NK-клетките и продукцията на перфорини.*(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 (Фиг. 3). И в двете зони Т-лимфоцитите представляваха около 2% от туморната маса. 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 $CD4^+$ Т-клетки, които са средно 0.088% от цялата туморна маса и $CD8^+$ 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.

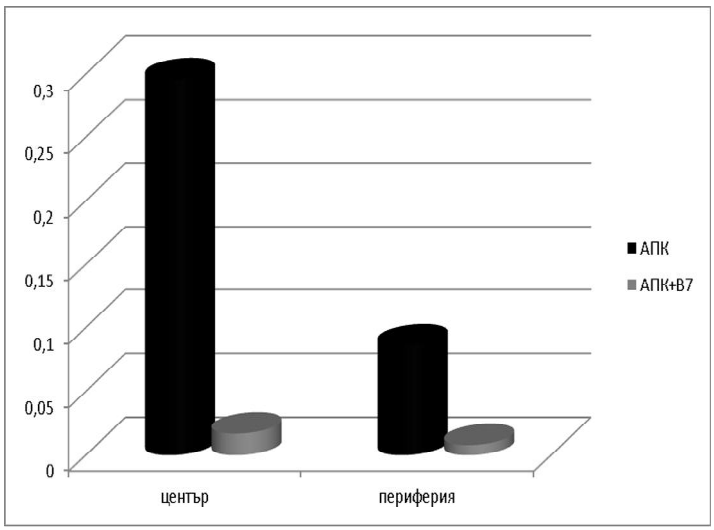


Фиг. 3 Разпределение на Т-лимфоцити в периферия и център от ГБМ, изразено в проценти от общата туморна маса.

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 NK-клетки) и че повечето от АПК и в двете зони не експресират ко-стимулаторния комплекс B7. (Фиг.4) Разликата в данните за инфилтрация на имунни клетки получени при изследването на две 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.



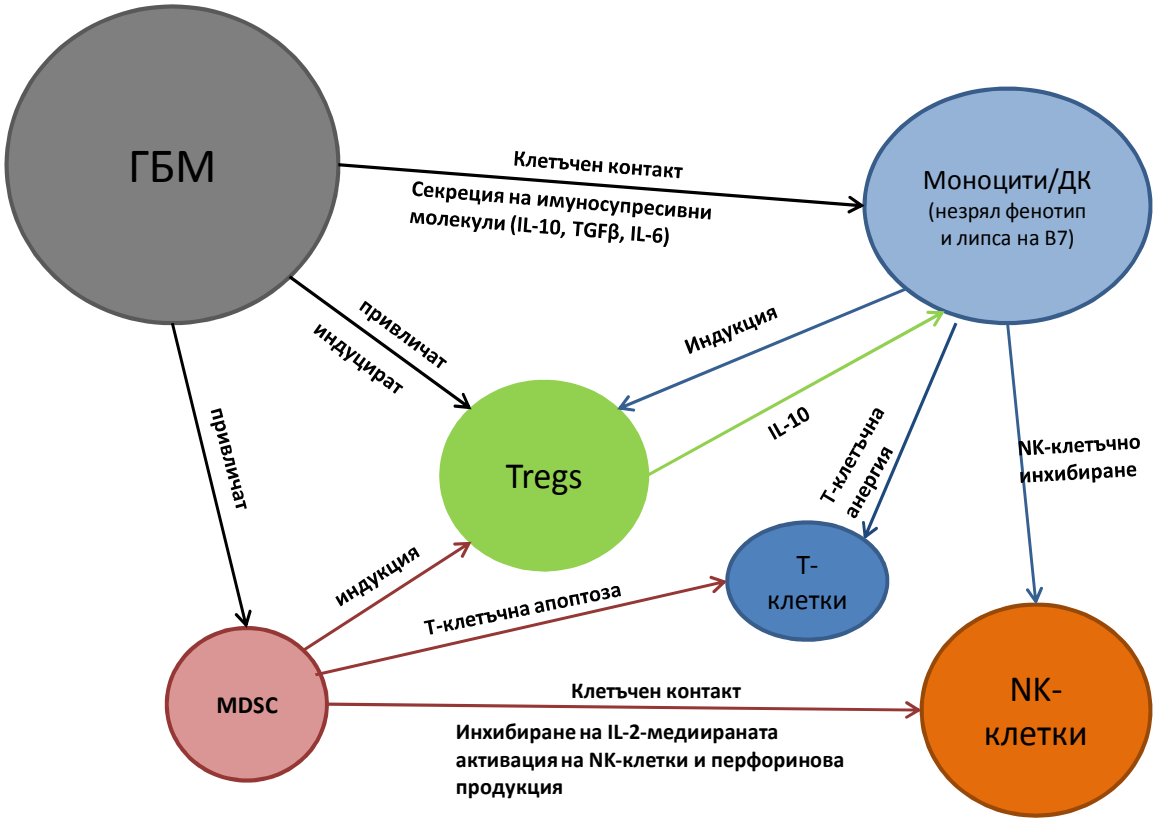
Б.

Фиг. 4 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 експериращи ко-стимулаторния комплекс B7 (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 ефективният 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. (Фиг.5) За потвърждение на това предположение, обаче е необходимо да се извършат допълнителни изследвания.



Фиг. 5 Взаимоотношения между ГБМ и различни популации имунокомпетентни клетки, инфилтриращи туморната микросреда (на база наши резултати и литературни данни).

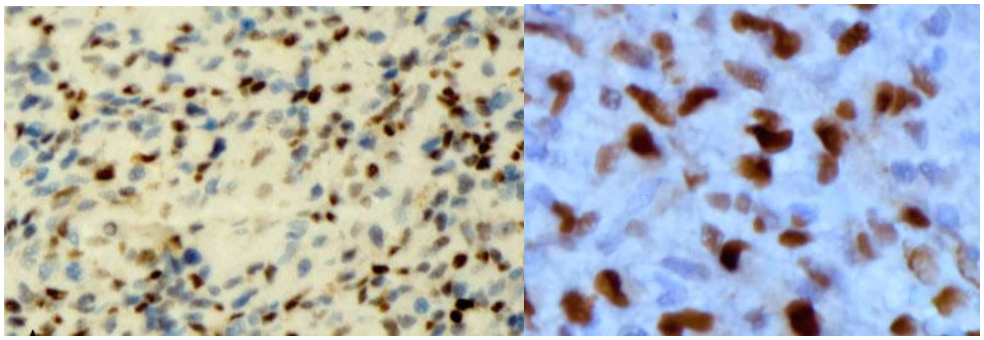
Туморът привлича и индуцира имуносупресивни клетъчни популации като Tregs и MDSCs и определя незрял фенотип и липса на B7 в антиген представящите клетки (моноцити/дендритни клетки). На свой ред тези клетки предизвикват супресия и/или апоптоза в ефекторните Т- и NK-клетки. ГБМ, а също MDSC и незрелите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

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, метастазиране и имунен отговор *(Johnston and Grandis 2011).* При нормални условия силата и продължителността на рецептор-индуцираната Stat3 активация са строго регулирани от множество ендогенни протеинови регулатори, като някои протеин-тирозин-фосфатази (SHP-2, PTP1B, PTPεC, TC45, SHP-1) *(Heinrich et al. 199, Leeman et al. 2006).* Научните изследвания показват, че той има централна роля в развитието, прогресията и поддържането на множество човешки малигнени заболявания, при които 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, TGFα, 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 TGFα 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). 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. В клетки от изследваните глиобластоми Stat3 беше търсен в активно състояние (фосфорилиран при тирозин 705 – 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. 6 А. и Б.)



А. Б.

Фиг. 6 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 генна 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 относителнно по-благоприятно протичане на заболяването. Нашите резултати не показаха експресия на този протеин при имунохистохимичното му изследване (резултатите не са показани).

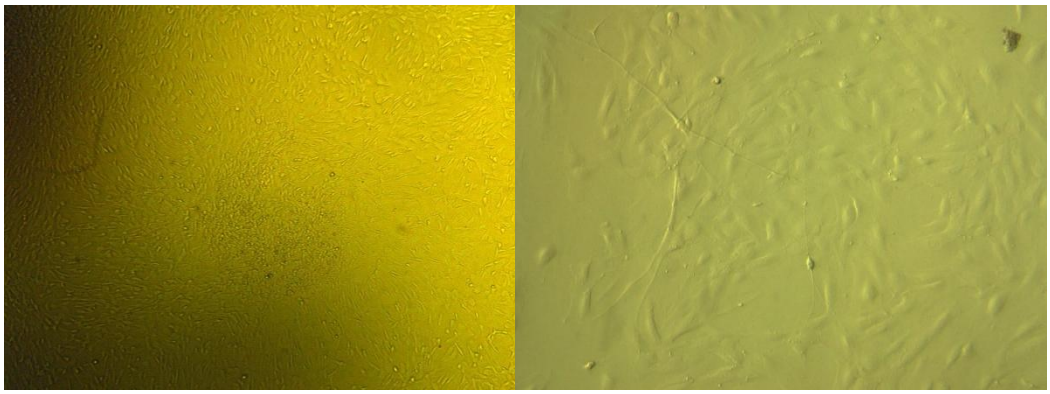
3. Резултати получени при клетъчно култивиране на клетки, изолирани от ГБМ

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*. 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 туморни стволови клетки (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 стволово-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 взехме 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 контрасна 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.

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.7) Не беше наблюдавана разлика в растежа и морфологията на клетки, изолирани от различните области на тумора.



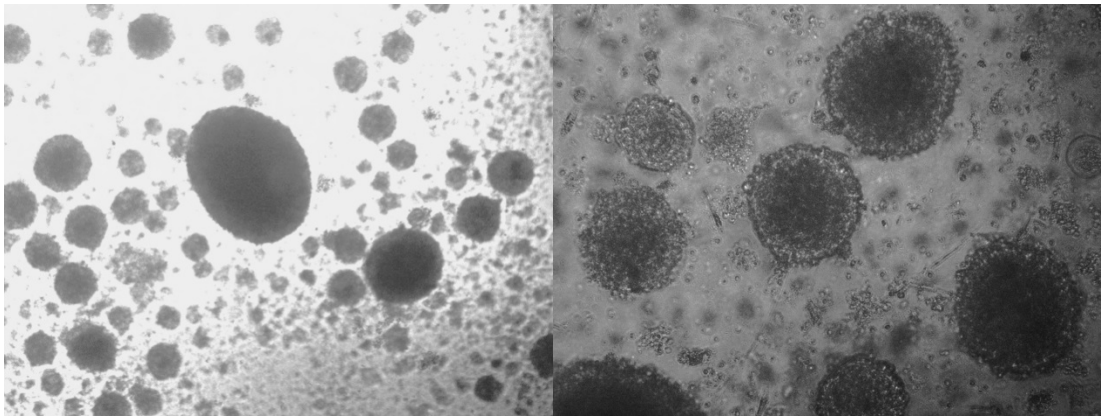
А. Б.

Фиг. 7 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 10х); Б. Клетъчна култура от клетки, изолирани от периферната област на ГБМ. (увеличение 20х)

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 за формиране на

НС – безсерумна среда с фактори EGF и bFGF. В съгласие с литературата и в нашите експерименти отглежданите по този начин клетки формираха плуващи НС. (Фиг. 8)



Фиг. 8 НС, формирани от клетки, изолирани от ГБМ при култивиране с EGF и bFGF и без наличие на серум в средата

3.3. Култивиране на клетки, изолирани от ГБМ за получаване на наш „междинен" модел

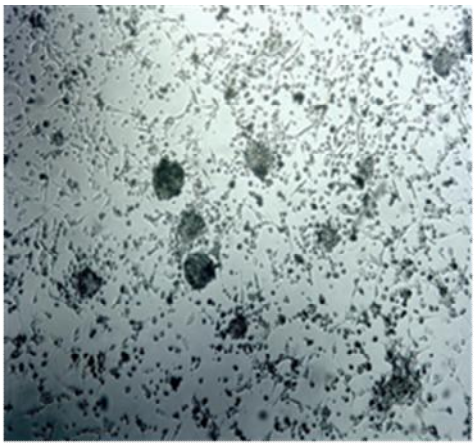
Клетките от ГБМ, които бяха отглеждани чрез наш междинен модел на култивиране (в среда със серум и добавени фактори EGF и bFGF) растяха подобно на тези, отглеждани само с 10% FBS. (Фиг.9 А.) Тоест наблюдаваха се клетки с фибробластоподобна морфология, които залепваха за дъното на плаката и с времето 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.9 Б и В.)

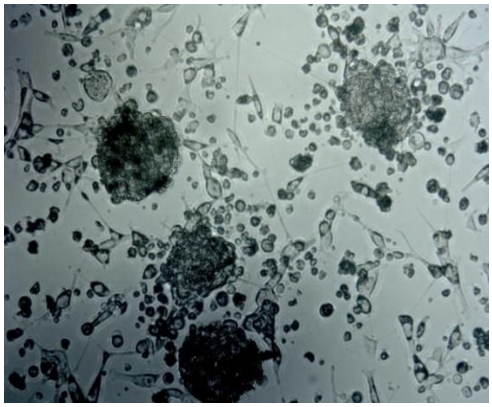
В литературата има данни, че клетки култивирани с необходимите растежни фактори, растящи като НС, могат да се трансформират в адхерентни клетки, ако бъдат поставени в серумна среда. Нашият екип също направи опит за трансформация на получените НС, като при поставянето им в среда със серум НС се държаха по описаният от останалите екипи начин и формираха монослой от адхерентни клетки. 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 (резултатите не са показани в автореферата).



А



Б



В

Фиг. 9Типове клетъчен растеж при наш междинен модел.
А. Адхерентен тип;
Б. и В. Семиадхерентен тип растеж

Глиобластома мултиформе е злокачествен тумор, който поставя множество проблеми, 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, 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 компоненти, отколкото в средата на нормалните НСК в обитаваните от тях 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 частично се диференцират *(Westermark 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 интензивна EGFR генна амплификация *(Westermark 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 и ТСК (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 АК, култивирани със серум без фактори. НС също така имат по-висок потенциал за самообновление и туморогенност и имат същите генетични алтерации като първичният тумор, за разлика от АК *(Kyurkchiev 2014)* Съществува, обаче и мнението, че двата вида клетъчни култури не са толкова ясно отграничими 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 друг 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.

Възоснова 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 същият 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 произхождатл. Резултатите, коментирани по долу се базират предимно на разработения от нас модел на клетъчно култивиране.

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

Основно изискване за доказване на клетки, изолирани от ГБМ, като ТСК 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). 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 процесите на клетъчна диференциация *(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 тъкан*(Matsuda et al. 2013).* CD133 е повърхностна молекула, експресирана от НСК, която предизвиква огромен интерес в научните среди. Функциите ѝ все още не са напълно изяснени, но се предполага, че участва вмеханизмите на клетъчен поляритет, миграция и взаимодействието на невралните стволовите 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).*

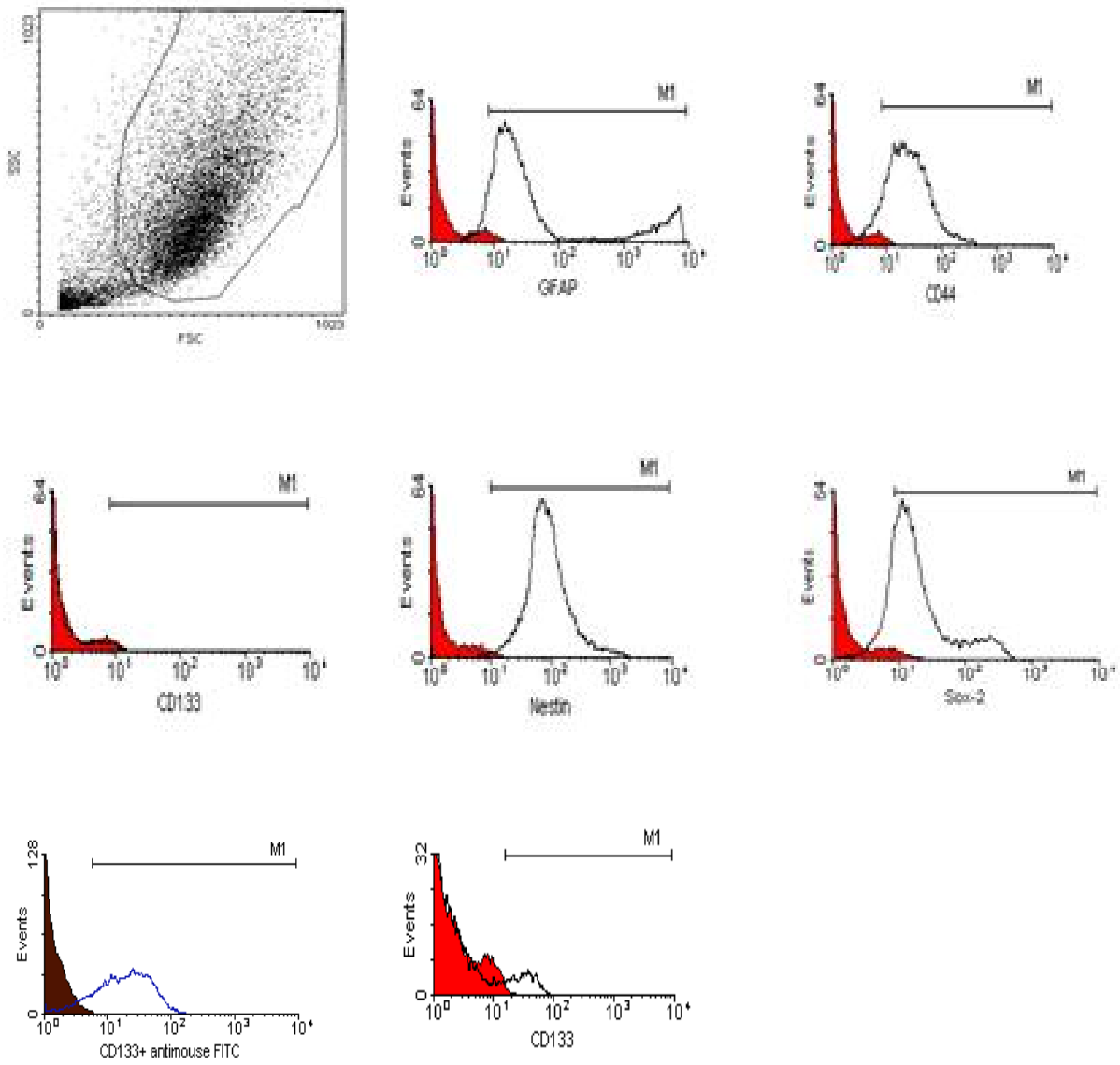
Експресията на споменатите пет маркера беше изследвана при клетки, изолирани от ГБМ и култивирани по наш междинен модел, с цел да се установи дали те носят фенотипната характеристика на ТСК.

4.1. 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 установена висок процент клетки, експресиращи Nestin, GFAP, Sox-2 и CD44 при всички изследвани култури (Фиг. 10). Резултатите показаха, че при клетъчни култури от ГБМ, култивирани по нашия междинен модел средно 97.1% от клетките експресираха 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. 10) Останалите клетъчни култури бяха отрицателни за този маркер.

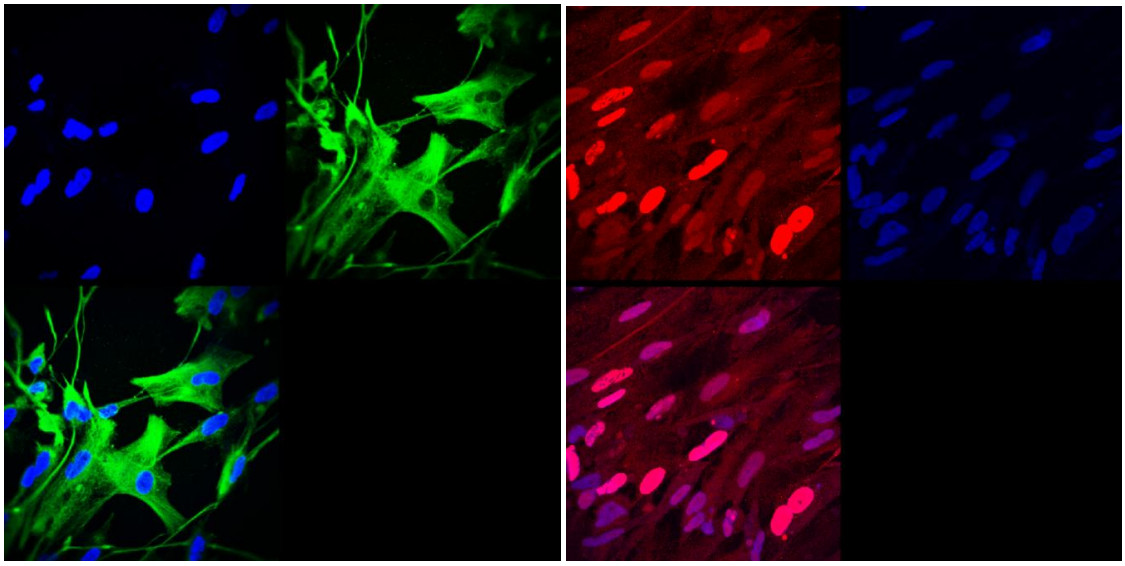
Клетъчни култури, растящи като НС бяха тестирани за същите маркери. Средните стойности за експресия бяха следните – Nestin-86,3%, Sox-2-30,7%, GFAP-74,1%, CD44-8,7%, CD133-12,6% от клетките в клетъчната култура. НС показаха висока експресия за маркерите Nestin и GFAP, подобно на клетките от междинния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



Фиг. 10 Флоуцитометрична експресия на основните маркери типични за неврални и туморни стволови клетки. На последните две хистограми са представени някои клетъчни култури с различна експресия на CD133 маркера.

4.2. 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. 11 А. и Б.)

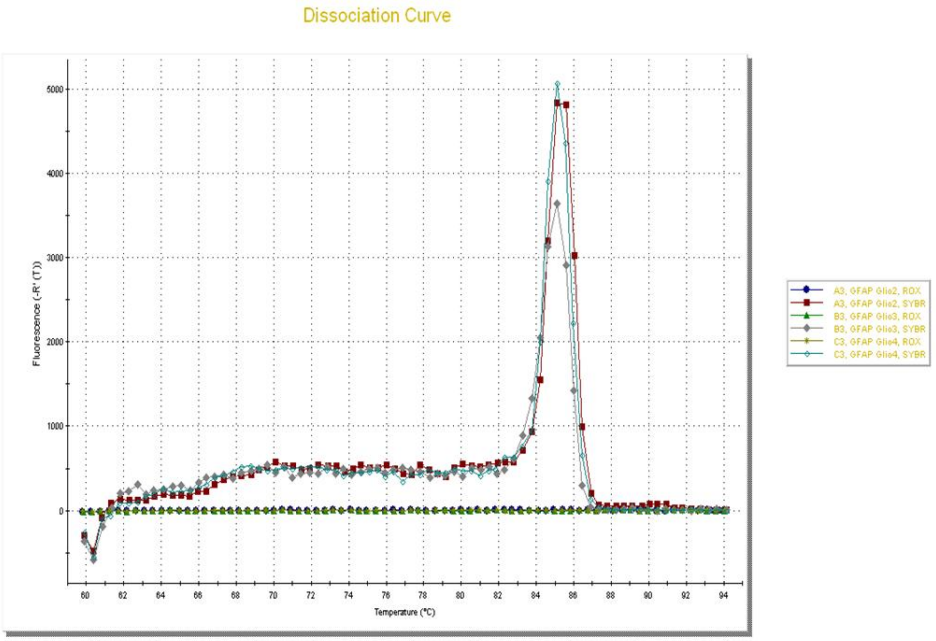


А. Б.

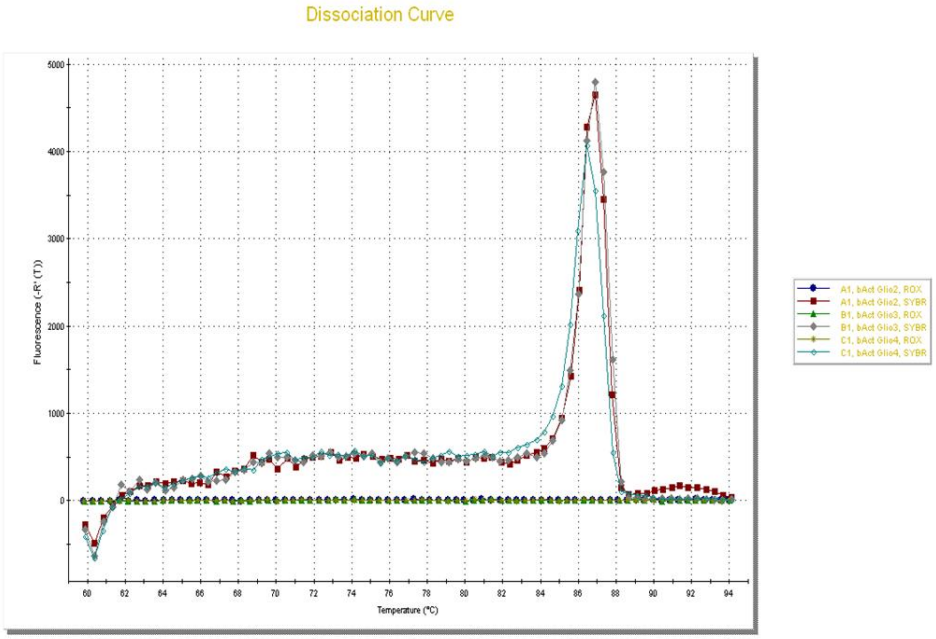
Фиг. 11.Изследване чрез конфокална микроскопия на клетки, изолирани от ГБМ.
А и Б. Изследване чрез конфокална микроскопия на клетки, отглеждани по наш междинен модел. Специфичната флуоресценция за Nestin се вижда в зелен цвят, тъй като второто анти-мише антитяло е белязано с Alexa Fluor 488, а за Sox-2 – в червен цвят, тъй като второто антитяло е белязано с Alexa Fluor 594.: А. Положителна експресия на Nestin ; Б. Положителна експресия на Sox-2. Ядрата на препаратите са оцветени с Hoechst 33258 и се виждат в син цвят.

4.3. Резултати, получени чрез qRT-PCR изследване

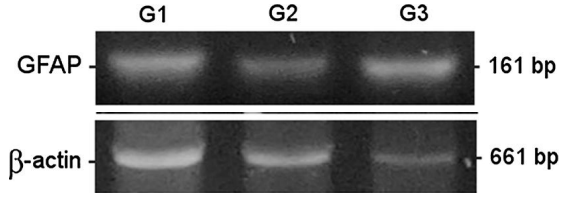
С цел да установим експресията на GFAP не само на белтъчно ниво, но и на ниво РНК, изследвана експресията й при 6 ГБМ клетъчни култури чрез RT-PCR в реално време (qRT-PCR). Като вътрешна контрола на изследването беше използван β-actin, за които е известно, че има константна експресия във всички клетъчни типове и не се повлиява от извършените третирания на клетките. Получената дисоциационна крива с еднопиков профил показва, че продуктът от амплификацията 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.12А, Б, В)



А.



Б.



В.

Фиг. 12 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 β-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 β-actin.

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, като в съответствие с данните в научната литература Sox-2 показа ядрена локализация. 3) qRT-PCR беше приложен на клетки култивирани по наш модел, за да бъде потвърдена експресията на маркера GFAP.

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 кулури, 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-Hema, 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 експресиран, 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, свързван 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 репрограмиране 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 участва в поддържането на раковите стволови клетки и регулира тяхното самообновление (*Weina and Utikal 2014*). CD44 също е клетъчно-

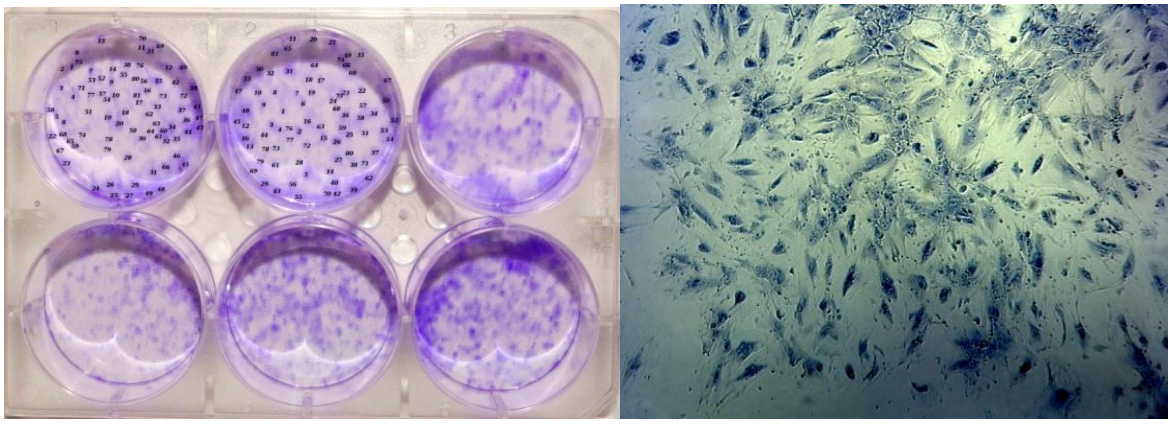
адхезионна молекула, която се експресира нормално от широк набор от клетъчни типове и тъкани, а също и при различни малигнени заболявания (*Ulhen et al. 2015*). Експресия на CD133 се открива при много от нормалните тъкани, също и върху клетки при други малигнени заболявания, като колоректален карцином, 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. 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, но както става ясно, установената експресия на маркери не е достатъчно доказателство, за да може тези клетки да се нарекат ТСК. За целата 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.

5. 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 Puck 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 тестирани култури. Клетките образуваха ясно разграничими колонии със сходни характеристики (Фиг. 13 А. и Б.) Способността за самообновление беше описана за около 2% от клетките в клетъчните култури, което отговаря на процента от общата туморна маса ТСК, описани в литературата за глиобластома мултиформе.



А. Б.

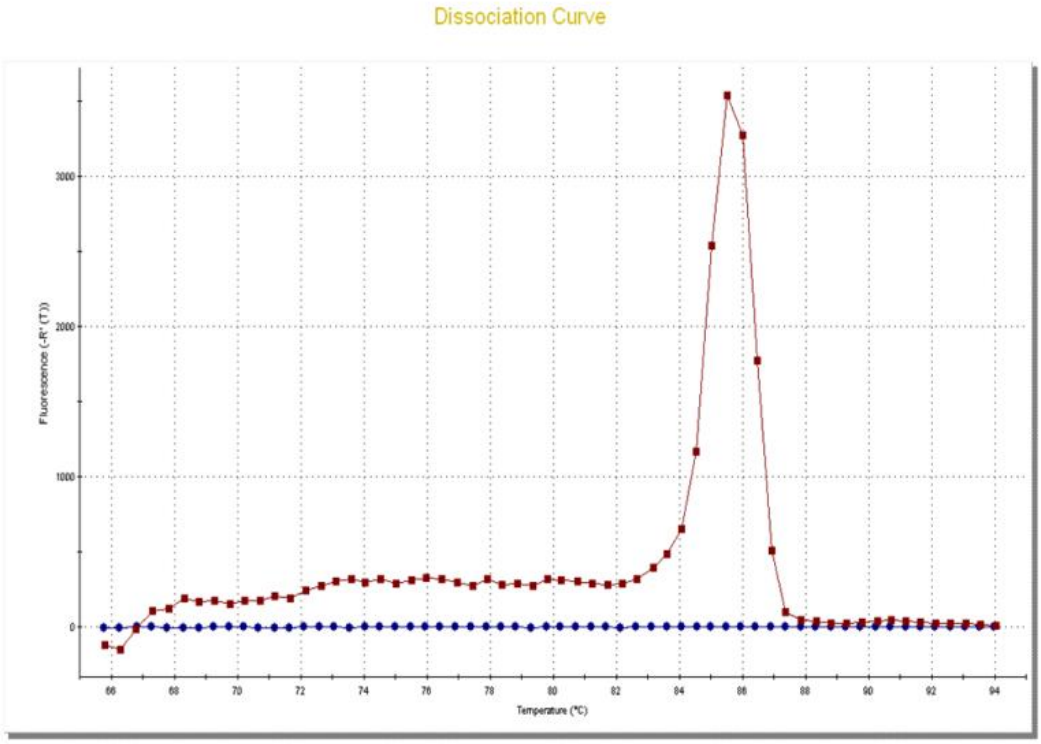
Фиг. 13 Клоногенен растеж на клетки от ГБМ клетъчни култури, култивирани по наш междинен модел Б. Оцветяване на колония с Crystal violet)..

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 възстановяването на тъканите през целият живот *(Seita and Weissman 2010).* Способността за самообновление е описана и при много ракови стволови клетки, включително и при тези на ГБМ. Това е един от основните процеси, който в комбинация с дезорганизацията на сигналните пътища, насочващи малигнените клетките 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, показа, 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.

6. 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 беше установена експресия на Stat-3, но не беше установена експресията на Stat1, който се счита за фактор, благоприятстващ оздравителните процеси и неучастващ в туморогенезата. Оказва 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. 14) Получените дисоциационни криви след амлификацията на копиДНК бяха с еднопиков профил, което доказва липсата на амплификация на неспецифични продукти.



Фиг. 14 Дисоциационна крива, показваща амплификация на копиДНК на Stat-1, получена от клетъчни култури, отглеждани по междинен модел.

Stat-1 е транскрипционен фактор, който може да се активира от много секреторни фактори като IFNα и IFNγ, 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).* Съществуват и научни данни за про-туморно действие на този фактор, под действие на IFNs, изразяващо се в устойчивост на радиация на туморни модели, включително и при 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 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 в микросредата на ГБМ да предизвиква експресията му, като изясняването на този въпрос се нуждае от провеждане на допълнителни изследвания.

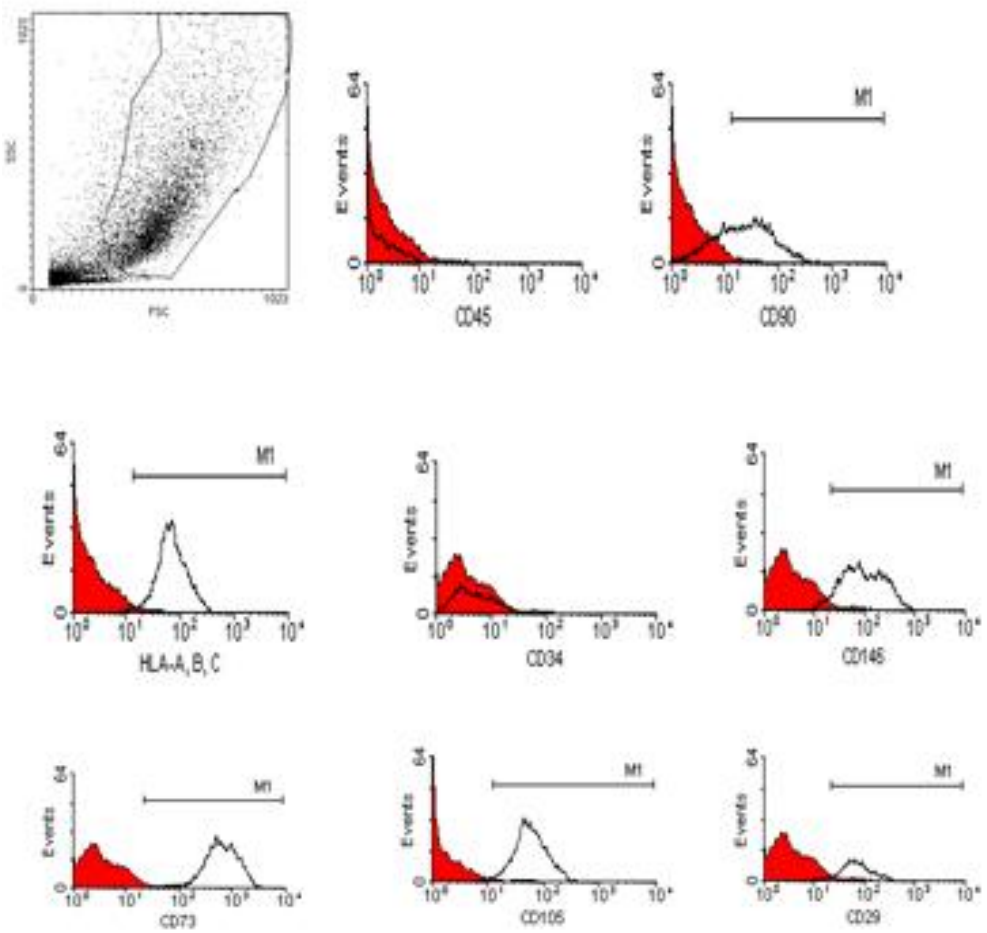
7. Експресия на маркери, характерни за МСК от клетъчни култури от ГБМ

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 International Society for Cellular Therapy (ISCT) *(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) ≥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 за CD45 и CD34. Клетъчните култури от ГБМ бяха тестирани 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. 15)

Важно е се отбележи, че клетъчните култури, растящи като невросфери също бяха тестирани за споменатите маркери, но те не показаха експресията им (данните не са показани в автореферата) Друго наше изследване показа, че клетки култивирани като невросфери и поставени в среда за адхерентни клетки, придобиват морфология характерна за АК. 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. 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 (данните не са показани в автореферата).

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



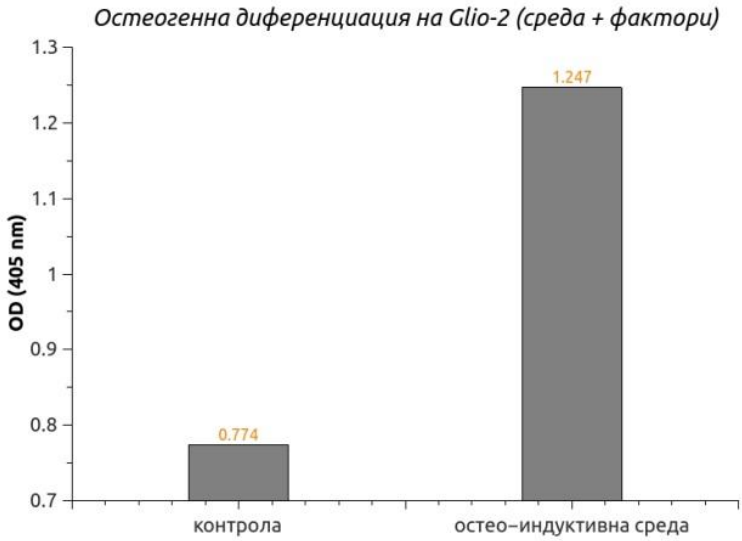
Фиг. 15 Флоуцитометрично изследване на маркери, характерни за МСК, при клетки, изолирани от ГБМ. На фигурата са представени хистограми, показващи положителна експресия за CD73, CD90, CD105, CD29, CD146 и HLA-A,B,C и липса на експресия за маркерите CD34 и CD45 при клетъчни култури, от ГБМ отглеждани по наш междинен модел.

8. Остеогенна и адипогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ

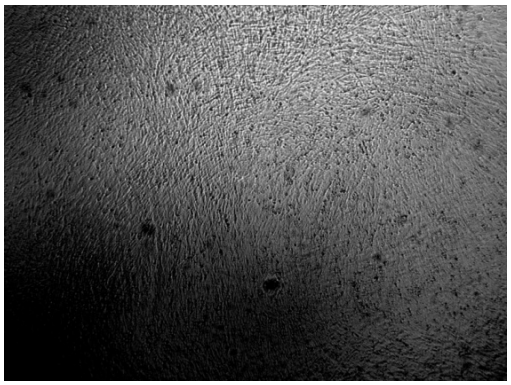
На базата на описаните дотук аналогии между МСК и клетките изолирани от ГБМ и култивирани по наш модел (морфология, самообновление и фенотип), както и в опит да се отговори на първия въпрос ние продължихме да изследваме свойства типични за

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 Ca^{2+} кристали в екстрацелуларния матрикс. В края на стимулационния период беше установена повишена алкално-фосфатазна активност на клетките (Фиг. 16 А.) в сравнение със съответни контролни клетъчни култури. Наличието на Ca^{2+} кристали беше доказано чрез оцветяване по von Kossa и чрез ализарин ред. (Фиг. 17 А. и Б.)

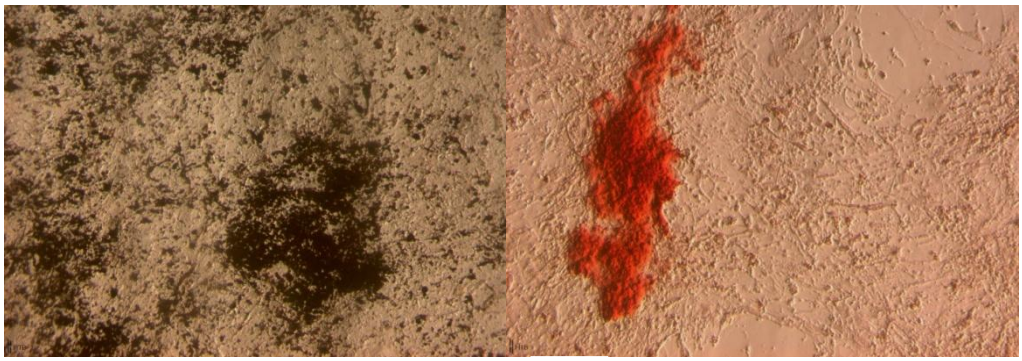
При същата серия от експерименти проведени с ГБМ клетки култивирани по класическия метод за получаване на АК също беше установена повишена алкално-фосфатазна активност, като степента на тази активност беше съизмерима с тази, установена при клетъчните култури, отглеждани по нашия междинен метод (резултатите не са показани в автореферата).



Фиг. 16 Количествено отчитане на степента на остеогенна диференциация при ГБМ клетъчни култури чрез тест за алкално-фосфатазна активност.



А.



Б. В.

Фиг. 17 Остеогенна диференциация на клетъчни култури от ГБМ, отглеждани по наш междинен модел. А. Клетки култивирани в контролна среда; Б. Клетки култивирани в остеоиндуктивна среда, специфично оцветяване за остеогенна диференциация по vonKossa (черно оцветено Ca^{2+} отлагания); В. Специфично оцветяване за остеогенна диференциация с ализарин ред (червено оцветени Ca2+ 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. 18)



Фиг. 18 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

трите вече описани критерия. Те растат в монослой като прилепнали фибробластоподобни клетки, като проявят експресия на маркери, характерни за МСК. 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 ГБМ човешка клетъчна линия U87MG с характеристика на АК експресира CD29, CD44, CD166, CD90, CD105 и CD73, а липсва експресия на CD45, CD133, CD14, HLA-DR и CD31. Авторите 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).*

Култивираните по наш модел клетки, изолирани от ГБМ проявяват характеристики типични за МСК, които на база минималните критерии на ISCT биха могли да ги определят като такива. Те проявяват характерна морфология, фенотип, свойството самообновление и диференциация в остеогенна насока. Въпреки това, за да твърдим със сигурност, че изследваните клетки са МСК, трябва да се проведат още изследвания като диференциация до адипоцити и хондроцити. Данните за прилики със ТСК също внасят съмнение във възможността за точно определяне на клетките, което налага и изясняване на въпроса за туморогенността на култивираните от нашия екип клетки.

9. 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^{0}C супернатанти от 16 ГБМ клетъчни култури, култивирани по наш модел и от 10 глиобластоми, култивирани като невросфери бяха тестирани за наличие на следните 13 цитокина: IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-18, IL-23, TNFα, IFNγ, TGFβ1, sPECAM, 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 за MMP10. Резултатите от средните стойности за цитокините са дадени в Таблица 1.

Таблица 1 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	1696,80	2033,35	35,70	N/T	0	13,15

Супресията на клетъчно медиирания имунитет, както на локално, така и на системно ниво, установена при пациенти с ГБМ се свързва с освобождаването на различни имуносупресивни 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)*. 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). Има данни, че IL-6 води до поддържане на ДК в незряло/толерогенно състояние *in vivo* с липса на експресия на ко-стимулаторния комплекс B7, каквато наблюдаваме и ние, като това се постига чрез дъгата IL-6-gp130-Stat3. (*Park et al. 2004)* 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-kB 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. 201.)* В съответствие с литературните данни за секреция на IL-6 от тумора, клетъчните култури, отглеждани като НС и по наш междинен модел показаха секреция на IL-6.

IL-8 е въвлечен 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-1β, TNFα, IFNγ, 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 факта, 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. Наред с описаните свойства, IL-8 осъществява своето действие чрез инхибиране на апоптозата на ендотелни клетки и индукция на продукцията на матриксни металопротеинази (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 металопротеиназа 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 металопротеиназа 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.

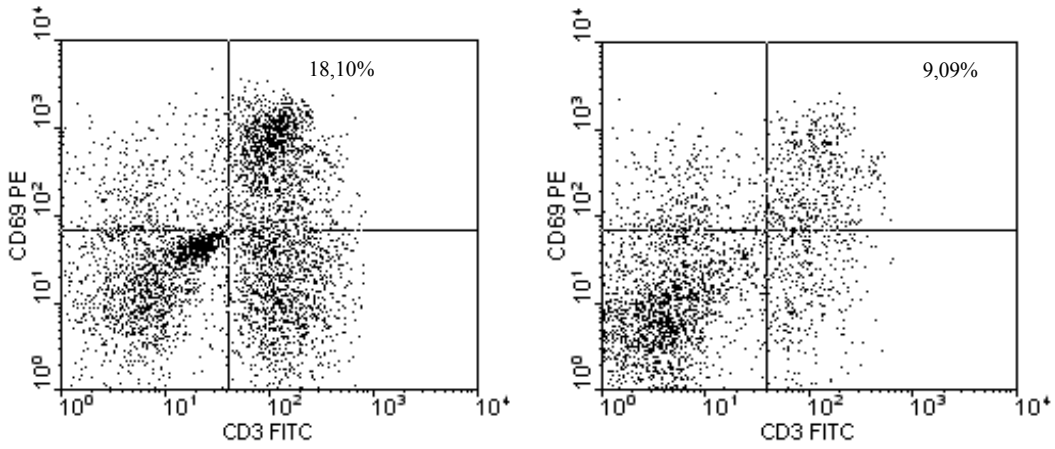
Следвайки аналогията между нашите култивирани клетки и МСК е важно да се отбележи, че мезенхимните стволови клетки, постоянно секретират големи количества от IL-6 и IL-8 *(Kyurkchiev et al. 2014).* Все повече данни сочат, че МСК са участници в постнаталната васкулогенеза, особено в случаите на тъканна исхемия и туморна васкуларизация. Установено е, че IL-8, отделян 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 секретиращи 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 при ГБМ установяват тумор-асоциирани МСК секретиращи IL-6 и IL-8.

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/или тумор-асоциираните МСК чрез секрецията на тези цитокини, участват в процесите на привличане на нови МСК в туморното обкръжение, които да поддържат процесите на растеж и ангиогенеза, характерни за тумора.

10. Изследване на влиянието на супернатанта от ГБМ клетъчни култури върху активацията на PBMCs

Секрецията на цитокини, част от свойствата, на които се свързват с обуславяне на имунен 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 PBMCs от здрави 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 има селективно митогенно действие върху Т-лимфоцитната популация от PBMCs и резултатите бяха отчетени чрез флоуцитометричен анализ. (Фиг. 19) Активацията на Т клетките беше доказана чрез експресията им на CD69, който е класически ранен лимфоцитен активационен маркер.

Изследването показа, 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 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 2 са представени индексите на стимулация на Т-лимфоцити, третирани със среда от съответната ГБМ култура в сравнение с третираните с контролна среда при 8 експеримента.



А. Б.

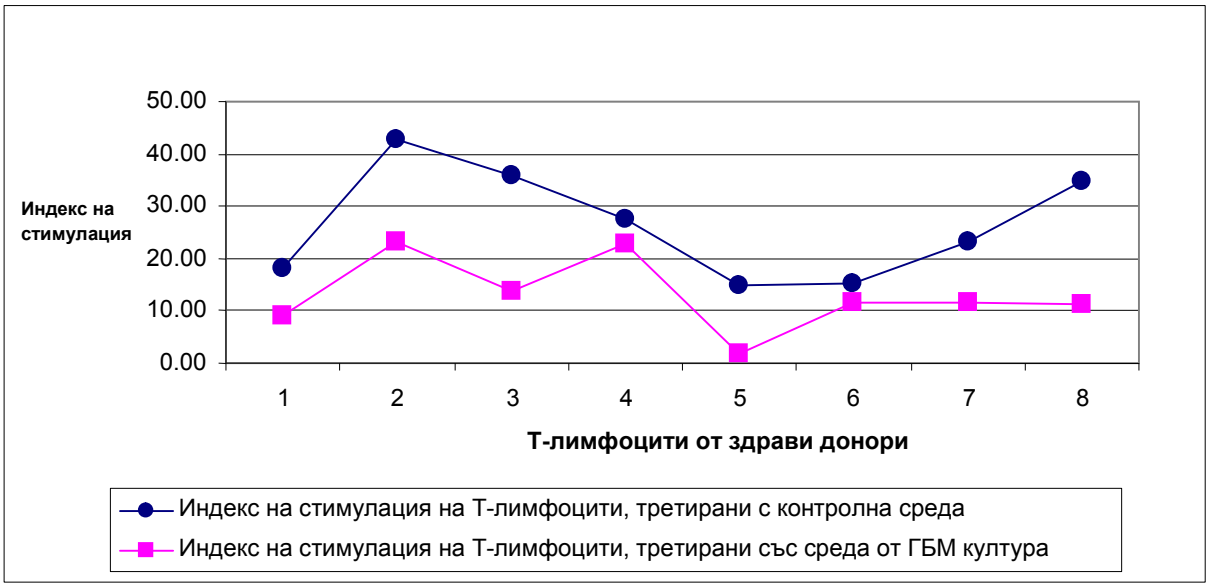
Фиг. 19 Флоуцитометрично отчитане на активацията на Т-лимфоцити. Отчетени са клетки, двойноположителни за CD3 и CD69. А. Двойно-положителни по CD3/CD69 Т лимфоцити, култивирани в контролна среда. Б. Двойно-положителни по CD3/CD69 Т лимфоцити, култивирани в среда от клетки, изолирани от ГБМ.

Таблица 2. Индекси на стимулация на Т-лимфоцити, съответно третирани с контролна среда и със среда от ГБМ култури *(Тумангелова-Юзеир и кол. 2015)*

	Индекс на стимулация на Т-лимфоцити, третирани с контролна среда	**Индекс на стимулация на Т-лимфоцити, третирани 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
Средна стойност на индекс на стимулация	**26.53**	**13.18**

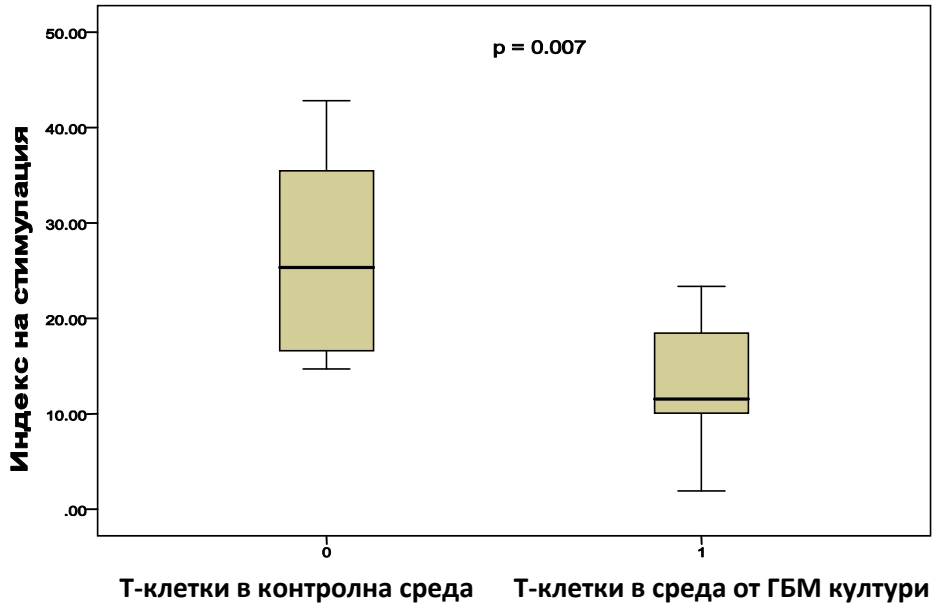
При обработка на данните се забелязва, че при някои донори Т-клетките, третирани със среда от ГБМ клетъчни култури и третирани с контролна среда имат близък индекс на стимулация (номер 4 и 6). Въпреки това, при всички изследвания по-

ниски остават индексите на стимулация на Т-лимфоцитите, култивирани в среда от ГБМ култура. (Фиг. 20)



Фиг. 20 Индекси на стимулация наТ-клетки, получени от здрави донори и отбелязани като поредни числа, съответно третирани с контролна среда и третирани 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.21)



Фиг. 21 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, секретиращи този цитокин. Това би могъл да бъде един от механизмите, чрез който се потискат 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 е 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 касаещи мезенхимни стволови клетки, обратно показват, че култивирането на Т хелпери в среда от МСК води до формирането на Tregs, секретиращи 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 на нашето е изследването на *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 пациенти с ГБМ.

Изследването на влиянието на супернатантата от клетки изолирани от ГБМ и култивирани по наш метод върху способността за активация на Т-лимфоцити показа, че без съмнение клетките от ГБМ секретират фактор/и, които потискат Т клетките. При ГБМ е установена секреция на имуносупресивни фактори с такова действие като TGFβ1,2, IL-10, VEGF, PGE2 *(Elliott et al. 1992),* докато при МСК, факторите със супресивно действие върху Т клетъчната субпопулация са IDO, PGE2, HGF, CCL2, CCL5, HLA-G5. (*Kyurkchiev et al. 2014*). В супернатантите при клетките култивирани по наш междинен модел, ние не установихме наличие на TGFβ и IL-10, като VEGF, PGE2, HGF, CCL2, CCL5, HLA- G5и 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

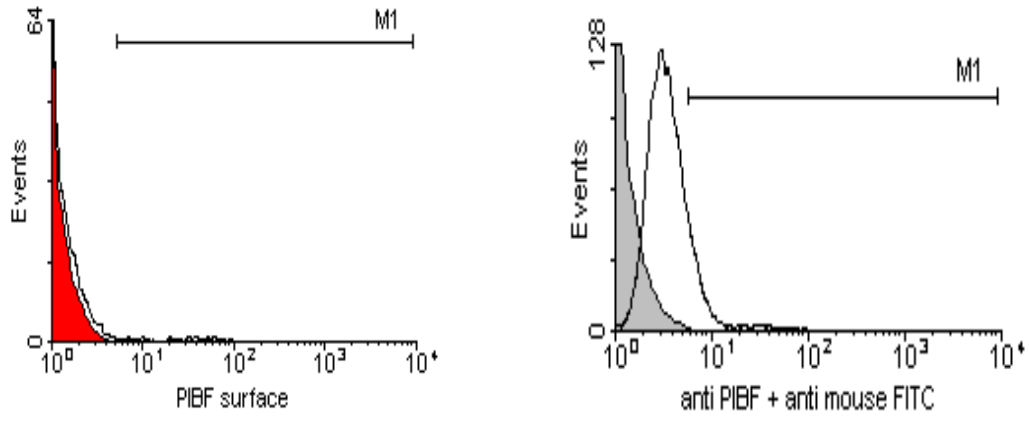
изследване, но използвайки като клетъчен субстрат невросфери, като резултатите разкриват, че супернатанта от клетъчните култури инхибира пролиферацията и секрецията на про-инфламаторни цитокини от Т-лимфоцитите, индуцира формирането на Tregs и предизвиква Т-клетъчна апоптоза. Изследването за цитокинова секреция на получените от тях НС показва липса на IL-6 и наличие на PGE2, TGFβ, VEGF, CCL-2 и галактин-3. Те доказват, че супернатантата от НС предизвиква активация на Stat3, както в туморните клетки, така и в Т-лимфоцити и че блокирането на Stat3 активацията чрез Stat3 siRNA в култивираните туморни клетки, намалява активацията на транскрипционния фактор в Т клетките. Установено е, че активираният в ТСК Stat3 води до секреция на имуносупресивни фактори, които активират същия транскрипционен фактор, не само в Т лимфоцитите, но и 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 и/или МСК те биха могли да предизвикат супресия на Т-лимфоцитите по пътя на дъгата IL-6 – JAK-Stat3.

11. PIBF експресия в клетъчни култури от ГБМ

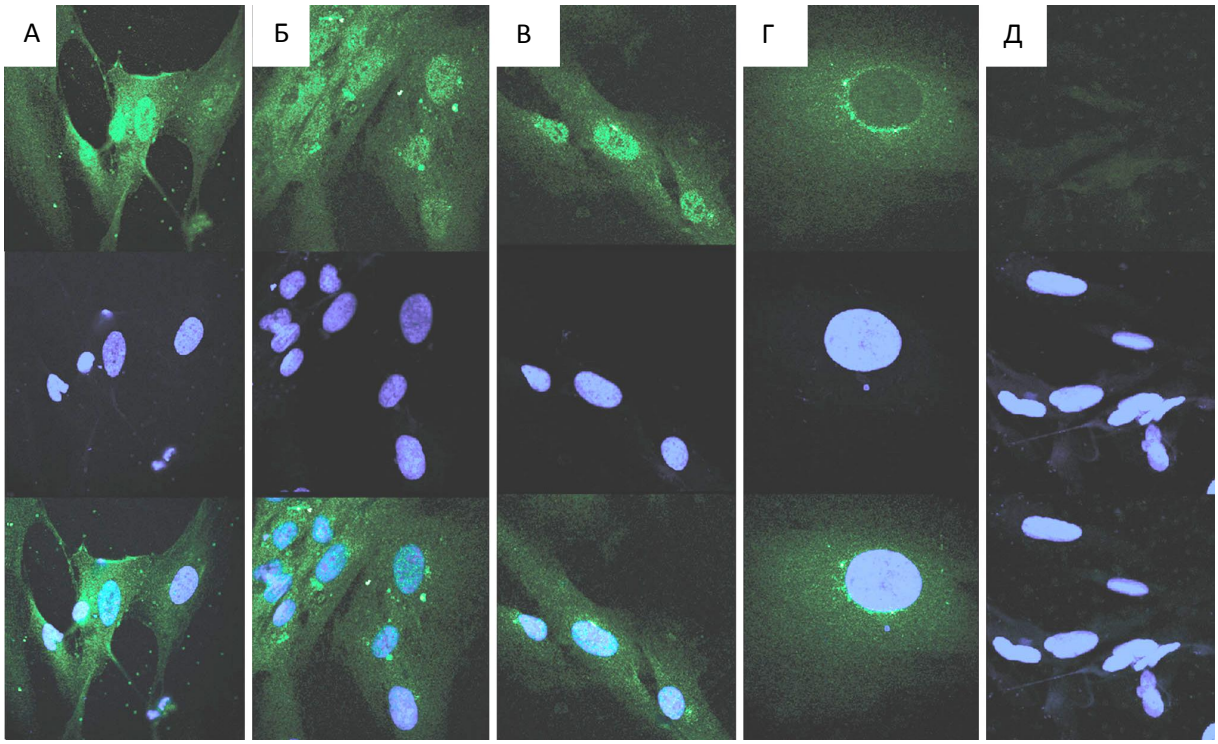
Освен чрез цитокини имунния отговор може да бъде модифициран и чрез специфични фактори, един от които е известен като progesterone induced blocking factor (PIBF). Този фактор е добре описан при множество клетки, включително МСК и обуславя част от имуносупресивните клетъчни свойства. *(Kyurkchiev et al. 2013)* Въпреки, че е установен като експресиран под действието на прогестерон, днес има все повече доказателства, че той може да бъде експресиран и независимо от хормона под действието на други фактори. *(Lachmann et al. 2004)*. Поради голямото сходство на нашите 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 – флоуцитометрия, 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 показа 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.22)



А. Б.

Фиг. 22 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.

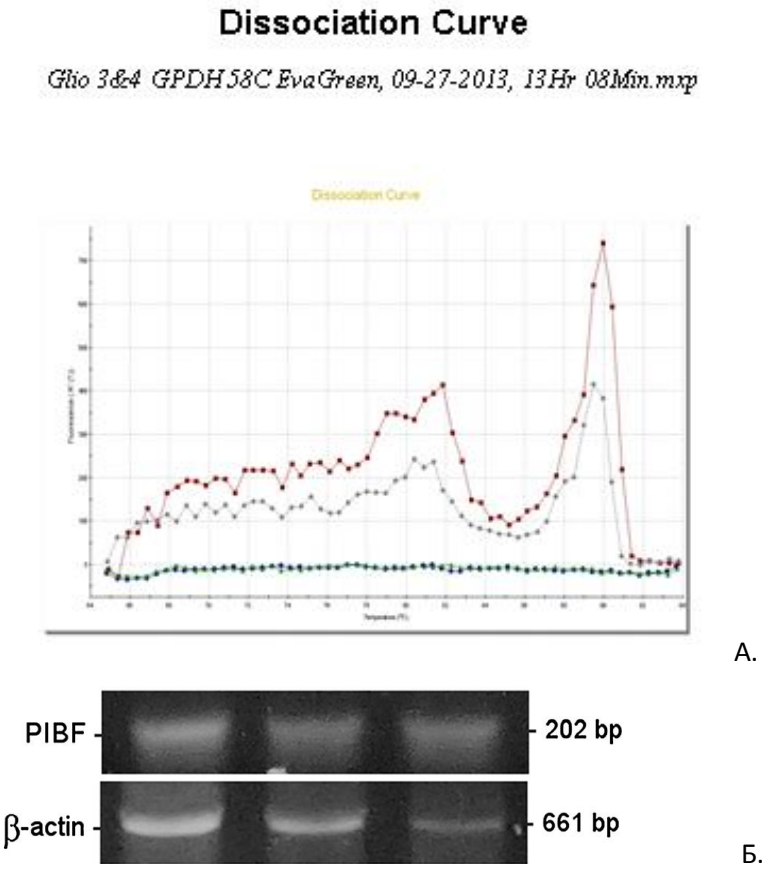


Фиг.23 Положителна експресия на PIBF в клетъчни култури от ГБМ (наш междинен модел). Специфичната флуоресценция се вижда в зелен цвят, тъй като второто анти-мише антитяло е белязано с Alexa Fluor 488. Ядрата са оцветени с Hoechst 33258 и се виждат в син цвят.: А. Хомогенно цитоплазмено и фино гранулирано ядрено оцветяване на PIBF (увеличение 400х); Б. Гранулирано цитоплазмено и точковидно перинуклеарно (увеличение 400х); В. Гранулирано ядрено оцветяване (увеличение 400х); Г. Перинуклеарно оцветяване (увеличение 630х); Д. Контролни клетки без добавено антитяло срещу PIBF (увеличение 400х).

Изследването на клетъчните култури чрез имуноцитохимия и конфокална микроскопия показа, че част от клетките експресират PIBF, като той може да бъде с различни форми на ядрена или на цитоплазмена локализация. (Фиг. 23)

На Фиг. 23 А. се наблюдава хомогенно цитоплазмено с фино гранулирано ядрено оцветяване, докато на Фиг. 23 Б. – гранулирано цитоплазмено и точковидно околоядрено оцветяване. На Фиг. 23 В. и Г. са представени самостоятелна експресия на, съответно, гранулирано ядрено и перинуклеарно оцветяване. Различните типове на светене и различната локализация на PIBF 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 PIBF 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 β-actin. Продуктите на реакцията бяха анализирани в агарозен гел, оцветен с етидиев бромид. (Фиг. 24 А. и Б.)



Фиг. 24 Изследване на експресия на PIBF 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 PIBF

Установяването на експресията на PIBF чрез три различни метода недвусмислено показа наличието на този фактор в клетъчни култури от ГБМ, култивирани по наш междинен метод. PIBF беше установен и при клетъчни култури, култивирани и по класически метод за АК, като изследването беше проведено чрез имуноцитохимия и конфокална микроскопия (резултатите не са показани в автореферата).

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 имуносупресивен ефект чрез потискане на NK-клетъчната цитотоксична активност, лимфоцитната цитотоксичност и насочване на имунния отговор 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 центрозомите протеини, за които е известно, че свръхекспресията или мутацията им могат да бъдат свързани с 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).* Един 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).* 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,* което би могла да бъде ситуацията при нашите клетки. 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.

От казаното до тук може да предположим, че PIBF е един от основните фактори, осигуряващи оцеляването и развитието на ГБМ. Неговата способност да потиска NK и Т-клетъчната цитотоксичност и да насочва цитокиновата секреция към Th2 тип клетки, секретиращи 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 източник на PIBF и че те представляват депо за този протеин. (*Kyurkchiev et al. 2011*). Казаното дотук относно експресията на PIBF от култивираните по наш модел клетки, изолирани от ГБМ е още една податка към хипотезата, че те представляват тумор-асоциирани МСК. Това не изключва възможността клетките ни бидейки 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.

12. Култивирани по наш модел клетки, изолирани от ГБМ – ТСК или МСК?

Както стана ясно култивираните 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 култивирани 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, като способността им за самообновление и екпресията 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, 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, βIII-tubulin и NeuN от МСК, изолирани от различни източници (мастна тъкан, кожа, периодонтален лигамент и дентална пулпа). Резултатите им показват експресия на βIII-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 експресират този фактор *in vivo*, но стопират експресията му при *in vitro* култивиране. 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 3.

Таблица 3 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	Клоно-генност
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 дадат ясен отговор на въпроса какви са изолираните от ГБМ и растящи като адхеренти клетки в съответната среда стволови клетки – МСК или ТСК.

Идеята да се обясни експресията на маркери, характери 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 neurotic factor), невротропин-3 и 5-азицитидин, водещи до индукция на маркери на неврална диференциация при МСК. *(Sanchez-Ramos 2000).* Описано е обаче, че до същия ефект водят и множество детергенти, високо pH, високомоларен NaCl, редуциращи агенти, антиоксиданти, както и култивиране върху различни повърхности. *(Lu et al. 2004; Qian et al. 2004; Krabe et al. 2005; Phenney 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). Cho et al. 2005* 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 процесна 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 адхерентни клетки, изолирани от ГБМ 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*.

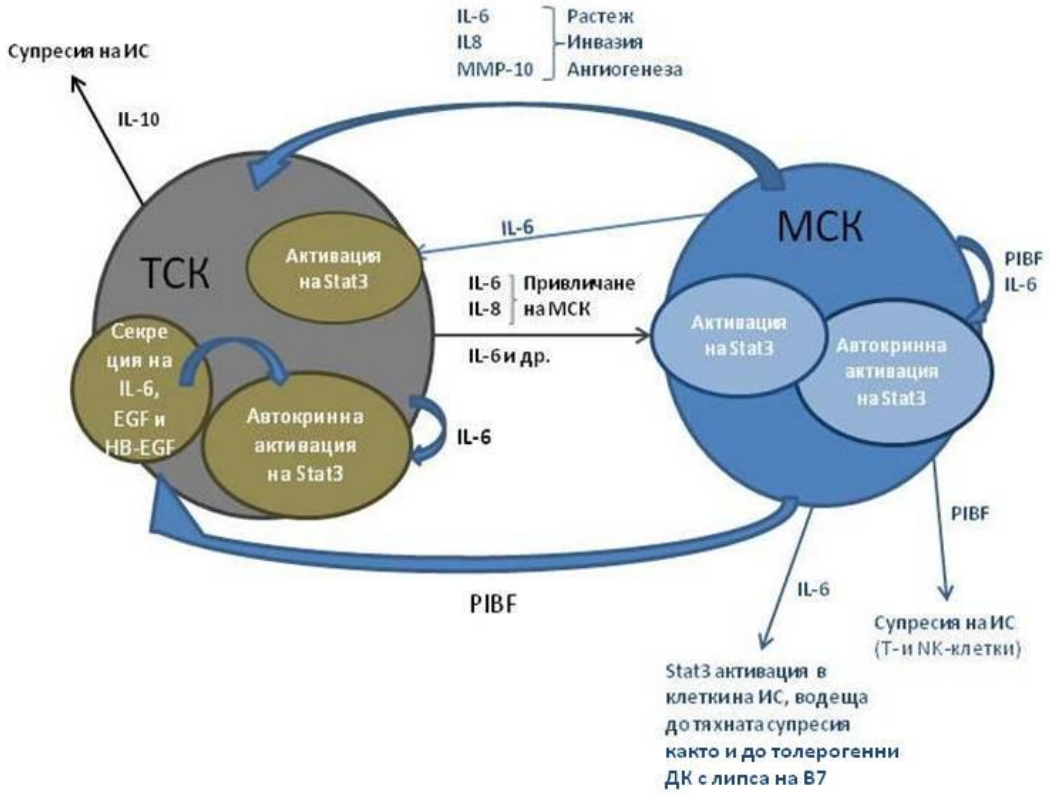
Допълнителни въпроси предизвиква и отчетената положителна експресия на Stat1 от клетъчните култури, отглеждани по наш междинен модел, на фона на отрицателната експресия, отчетена при изследване на туморен материал чрез имунохистохимия. Установено е, че този транскрипционен фактор се активира при МСК вследствие на IFNγ 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 PIBF, 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 предположеното 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 IL-6. След ко-култивиране с С6 глиомна клетъчна линия почти всички МСК проявяват фенотип на малигнени клетки, формират тумори в nude мишки, повишават секрецията си на IL-6, както и експресията на Stat3 и фосфолириран Stat3. Подобни резултати групата наблюдава и при третиране на МСК само с IL-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 многобразие на туморната микросреда *in vivo*. (Фиг. 25)



Фиг. 25 Предполагаем модел на взаимодействия между ТСК и тумор-асоциираните МСК, както и влиянието на двата вида клетки и върху ИС, предвид новооткрития при клетъчни култури изолирани от ГБМ, PIBF. Моделът е изготвен на база наши и литературни данни, обясненията са посочени в текста.

Stat3 се оказва фактор от ключово значение за поддържането на туморния растеж и развитие при ГБМ. От една страна при ТСК от ГБМ се наблюдава активация на Stat3, която се поддържа от автокринното действие на IL-6. От друга страна ТСК секретират фактори, привличащи в туморното обкръжение МСК (IL-6 и IL-8) и активиращи в тях Stat3. Под действието на PIBF, секретиран от МСК в микросредата на тумора ТСК започват да секретират IL-6, EGF и HB-EGF. Всеки един от тези фактори може да предизвика допълнителна активация на Stat3 в туморните клетки. По тези пътища (а най-вероятно не само) се задвижва механизъм, който поддържа постоянно активиран транскрипционния фактор в ТСК и предизвиква секреция на големи количества IL-6 и IL-8.

Активираният в МСК Stat3 предизвиква секрецията на IL-6, IL-8 и MMP-10, които подпомагат туморните процеси – растеж, инвазия и ангиогенеза. Автокринното действие на IL-6 и на PIBF върху МСК също допълнително активират транскрипционния фактор Stat3. Отделените в

микросредата на тумора IL-6 и PIBF предизвикват супресия на имунните клетки и формиране на толерогенни ДК с липса на експресия на ко-стимулаторния комплекс B7.

Секретираният от ТСК и променените МСК IL-6, наред с многото си функции, води и до формирането на толерогенен тип АПК с липсваща B7 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.

Заключение

ГБМ е тумор, които предизвиква огромен интерес в научните среди, поради хетерогенния си строеж, сложните механизми, които участват в неговия растеж и устойчивост и факта, 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 NK-клетки) присъстват в микросредата на ГБМ, но вероятно са в супресирано състояние, като една от причините вероятно е липсата на експресия на ко-стимулаторни молекули от локалните АПК (дендритни клетки, микроглия/макрофаги, астроцити). Антиген-представящи клетки с липсваща експресия на B7 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*. Култивираните по новият модел клетки растяха като прилепнали фибробластоподобни клетки, силно наподобяващи мезенхимни стволви 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 PIBF 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 показа наличие на IL-6, IL-8 и MMP-10. Двата цитокина са установени, отново и и при МСК. MMP-10 все още е слабо изследван, но има данни за участието й 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 експресия на CD133, макар и при малък процент клетки. 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 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 израз 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 PIBF 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* при плъхове?

Каквато и да 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 опознаването на един толкова хетерогенен и устойчив на лечение тумор и характеризирането на процесите случващи се в микросредата му, е начинът, който ще доведедо успех борбата с това заболяване.

Изводи:

1. В туморната маса от ГБМ беше установена инфилтрация от Т лимфоцити, NK-клетки и АПК с липса на ко-стимулаторния комплекс B7.
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 – адхерентни клетки и невросфери.
4. Създаден беше нов модел на култивиране на клетки от ГБМ.
5. При клетки, изолирани и култивирани от ГБМ беше установена експресия на маркери, характерни за НСК/ТСК.
6. Установено беше свойството самообновление за култивираните клетки, изолирани от ГБМ.
7. Установена беше експресия на Stat1 при ГБМ култивирани клетки
8. Клетките, култивирани като невросфери и по наш модел показаха секреция на IL-6, IL-8 и IL-10 и MMP10.
9. Клетките култивирани по наш модел експресират маркери характерни за МСК и успешно осъществяват остеогенна диференциация
10. Клетки, култивирани по наш модел и по класически модел за адхерентни клетки експресират интрацелуларно PIBF.
11. Секреторни фактори от клетки, отглеждани по наш модел успешно потискат активацията на Т-лимфоцити, изолирани от здрави донори.

Приноси:

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена беше инфилтрация от Т- лимфоцити, NK-клетки и АПК с липса на ко-стимолаторен комплекс B7 в туморната маса на ГБМ.
2. Потвърдена беше възможността клетки, изолирани от ГБМ, да бъдат култивирани по двата класически модела.
3. Потвърдена беше възможността невросфери да преминават в адхерентни клетки 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. Потвърдено беше, че култивирани адхерентни клетки, изолирани от ГБМ, показват характеристики на МСК.

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 показаха експресия на маркери за НСК/ТСК 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 и описана експресия на PIBF от култивирани клетки, изолирани от ГБМ.

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.