

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013  
*А.Н. Лисяный, А.И. Потапова, А.Л. Кот*

## ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕДУЛЛОБЛАСТОМ И ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», г.Киев

**Вступление.** Предлагается использовать фенотипические маркеры как прогностические показатели.

**Цель.** Изучить фенотипические особенности клеток опухолей, полученных во время нейрохирургических операций.

**Материалы и методы.** Исследовано 37 медуллобластом и 12 астроглиальных опухолей, из которых готовили клеточные взвеси и с помощью панели из 8 моноклональных антител методом проточной лазерной цитофлуориметрии определяли фенотипические маркеры, ответственные за пролиферацию, апоптоз, метастазирование.

**Результаты.** Установлено, что медуллобластомы содержат меньше чем астроцитомы клеток, экспрессирующих онкопротеин P-53, Fas рецептор апоптоза и также нейрональную молекулу адгезии CD-56, что указывает на более высокий онкогенный потенциал этих клеток.

**Ключевые слова:** медуллобластома, онкопротеин P-53, Fas-рецептор апоптоза.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что развитие новообразований в организме сопровождается значительными генетическими, молекулярно-клеточными, метаболическими нарушениями в клетках опухоли. Направленность, интенсивность изменений в клетке при ее малигнизации во многом уже изучена и определена. Установлено, что в развитии опухоли задействуется как максимум 200,0 различных генов, происходит перестройка хромосомного аппарата клетки и изменяется экспрессия генов, ответственных за пролиферацию и ангиогенез, апоптоз клеток и устойчивость их к гипоксии (1,4,5,7,11).). Для опухолей головного мозга так же характерны подобные изменения, которые пытаются разделить на определенные группы (2,5,12,13,14). В последнее десятилетие, благодаря успехам в изучении молекулярно-генетических нарушений в опухолях мозга происходит усовершенствование классификаций злокачественных опухолей, созданных на данных классической гистологии в 40-50 годы 20 столетия (14,16,17). Делаются попытки усовершенствовать классификацию медуллобластом на основании изучения молекулярно-генетических нарушений в них и способности их к метастазированию (8,11,17). Выделяются 4 подтипа, отвеличающихся по экспрессии генов и нарушению в 2 внутриклеточных сигнальных путях (15,16,17). Важное значение придается изучению генов апоптоза и пролиферации, в частности гена P-53, молекул адгезии, ответственных за инфильтративный рост и метастазирование: изменение скорости пролиферации и роста, состава опухолевых клеток, нарушений в экспрессии антигенов

гистосовместимости, имеющих значение для иммунного надзора и противоопухолевого иммунитета (1,18,19). В то же время детально молекулярно-клеточные фенотипические характеристики опухолей мозга еще не изучены, не установлены особенности и признаки, характерные отдельным типам опухолей, таким как медуллобластомы или астроцитомы.

**Цель** - изучение молекулярно-фенотипическую характеристику экспрессии функционально важных молекулярных структур клетками медуллобластомы и астроцитом методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В исследовании использована опухолевая ткань, удаленная во время нейрохирургических операций у 37 больных с медуллобластомами и 12 больных с астроцитомы I–III степени анаплазии. Из опухолевого материала удаленного во время операции, выделяли небольшие кусочки, размером до 0,5 см<sup>3</sup>, которые помещали в питательную среду 199. Клеточную взвесь из опухоли готовили общепринятым методом (1,6).

В работе была использована панель из 8 типов моноклональных антител, выявляющих структуры, ответственные за активацию адгезию и апоптозные процессы, а также иммунные процессы в опухоли. Это следующие моноклональные антитела: СД-3, СД-45, которые выявляют антигены экспрессированы на лейкоцитах (СД-45) и Т лимфоцитах (СД-3), СД-34 – антитела, выявляющие гемопоэтические костимулирующие стволовые клетки; СД-56 антитела, выявляющие нейрональную молекулу адгезии, которая экспрессируется на нервных клетках и которая ответственна за адгезивную и миграционную способность клеток. СД-38 и СД-25 антитела выявляют активационные молекулы, характеризующие потенциал клетки, СД-38 молекула – это рибоза и СД-25 – это рецептор интерлейкина-2, который является цитокином, стимулирующим пролиферацию клеток. СД-95 антитело выявляет Fas-рецептор на клетках, который ответственный за апоптотическую готовность клетки, СД Р-53 антитело выявляет протеин, синтезирующий геном Р-53, который наиболее часто мутирует в опухолях.

Все моноклональные антитела были производства фирмы «Сорбент» (Россия) Института иммунологии РАМН. Постановку реакции с моноклональными антителами и клетками опухоли проводили согласно рекомендаций фирмы с учетом методических рекомендаций Института иммунологии (2001г.) (6).

Статистическую обработку материала проводили по пакету программы статобработки Statistica для ПК с определением М+м. Достоверность результатов определяли по критерию Стьюдента.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Проведенными исследованиями установлено, что между медуллобластомами и астроцитомы имеется фенотипическое подобие и выявляется во многом подобная экспрессия многих функциональных значимых молекул, что, по-видимому, является общей характеристикой злокачественных глиальных опухолей. В таблице 1 показаны результаты исследований по каждой конкретной

функциональной структуре или молекуле, а также по их отношению к клеткам иммунной системы. В частности обе группы пациентов были близки по возрасту. Средний возраст больных медуллобластомами составлял  $11,3 \pm 1,68$  года, а больных с астроцитомами I-III стадии анаплазии  $7,7 \pm 0,85$  года, т.е. большинство больных были детского возраста, что является характерной особенностью медуллобластом, которыми в 10 раз чаще болеют дети, чем взрослые. В суспензии исследованных опухолевых клеток присутствуют 11-12% клеток экспрессирующих общий лейкоцитарный антиген CD-45, что позволяет предположить, что в этих опухолях имеется определенные инфильтрирующие лейкоцитарными клетками – макрофагами, лимфоцитами, нейрочитами и т.д. Происхождение этих лейкоцитарных клеток в суспензии может быть как за счет внутриопухолевых клеток, так и за счет внутрисосудистых, внутрикапиллярных клеток, циркулирующей крови.

Таблица

**Процентное содержание клеток опухолей головного мозга, экспрессирующих различные молекулярные маркеры злокачественности**

Тип опухоли	Количество (n)	Возраст (лет)	% содержание CD положительных клеток							
			3	45	34	38	56	95	25	P-53
Медуллобластома	37	$1,13 \pm 1,68$	$6,3 \pm 1,27$	$11,4 \pm 3,35$	$3,3 \pm 0,72^*$	$21,3 \pm 2,07$	$21,4 \pm 2,9^*$	$17,64 \pm 1,9^*$	$13,67 \pm 2,44$	$12,05 \pm 1,9^*$
Глиальные опухоли	12	$7,7 \pm 0,85$	$7,8 \pm 1,6$	$12,84 \pm 1,9$	$6,93 \pm 0,8$	$16,24 \pm 3,17$	$27,9 \pm 2,83$	$22,58 \pm 2,8^*$	$12,5 \pm 1,8$	$24,84 \pm 2,65$

**Примечание:** \* - достоверные различия между показателями медуллобластомы и астроцитомы.

Важно то обстоятельство, что эти клетки примерно в одинаковых количествах присутствуют в обоих исследуемых типах опухолей. Среди опухолевых клеток медуллобластом и астроцитом присутствуют и Т лимфоциты в невысоком количестве (6-8%), что указывает на то, что эти иммунные клетки относятся к категории опухолинфильтрирующих лимфоцитов, способных осуществлять противоопухолевую защиту. Количество этих Т лимфоцитов в опухолях очень низкое, в 7-8 раз ниже, чем в крови и по этой причине вероятно развитие полноценных противоопухолевых цитотоксических реакций не происходит. Несколько неожиданным было выявление примеси гемопозитических CD-34+ клеток в небольшом количестве среди исследуемых суспензий опухолевых клеток, тогда как в крови у здорового человека гемопозитические клетки определяются в чрезвычайно малом количестве – 0,1-0,3%. Появление

гемопозітичних кліток в опухолі вважається показателем неблагоприятного прогноза, так як ці клітки учавають в ангиогенезе нових судин в опухолі (6). Сопоставляя уровни гемопозітичних кліток, виявляємых СД-34 анти-телами, можна отметить, что в медуллобластомах их в 2 раза меньше чем в глиальных опухолях, которые значительно сильнее, чем медуллобластомы васкуляризованы. Учитывая очень низкое содержание СД-34+ клеток в крови, трудно объяснить каким образом эти клетки оказались в опухолях, то ли они постепенно накапливались из клеток циркулирующей периферической крови, то ли они генерализовались из местно из каких-то других стволовых клеток, например мезенхимальных стволовых клеток.

Медуллобластомы содержат больше СД-38+ клеток, чем глиальные опухоли, выявляется  $21,3 \pm 2,07\%$  и  $16,24 \pm 3,17\%$  СД-38+ клеток соответственно, а количество СД-25+ клеток, экспрессирующих рецептор к интерлейкину-2 было примерно одинаковым в обоих типах опухолей и равнялось 12-14%. Выявлены различия в экспрессии медуллобластом и глиомами нейрональной молекулы адгезии. Если в астроцитарных опухолях содержалось  $27,9 \pm 2,82\%$  СД-56+ клеток, то в медуллобластомах  $21,4 \pm 2,20\%$  (<0,05) отсутствие или малое содержание СД-56+ клеток указывает на более высокий метастатический и инфильтративный потенциал этих клеток, так как отсутствует адгезивная сдерживающая миграцию молекула на поверхности клетки.

Клетки медуллобластом несколько менее подвержены апоптозу, чем глиальные астроцитарные опухоли, так как Fas рецептор экспрессирован только  $16,64 \pm 1,9\%$  клеток, а на клетках глиальных в  $22,58 \pm 2,8\%$  определяется Fas рецептор, хотя различия между этими величинами статистически не достоверны. Установлено достоверное отличие в содержании этих опухолей клеток экспрессирующих протеины типа Р-53, в медуллобластомах всего  $12,05 \pm 1,9\%$  клеток выявляли супрессорный Д протеин гена р-53, тогда как в астроцитомах было  $24,84 \pm 2,64$  таких клеток. Следовательно, можно утверждать, что медуллобластомы содержат больше клеток, в которых не выявляется продукт гена Р-53, то есть больше клеток, способных к неконтролируемой пролиферации.

Выявленные различия между медуллобластомами и астроцитомами опухоли способствуют не только более полному и широкому пониманию тех изменений, которые имеются в этих опухолях, но и указывают на то, какие молекулярные структуры должны быть направлено лечебные действия, например на увеличение уровня нейрональной молекулы адгезии, активации гена Р-53, усиления экспрессии рецептора апоптоза, торможение экспрессии рецептора интерлейкина и т.д.

## **ВЫВОДЫ**

- В медуллобластомах и асироцидных опухолях содержится примерно одинаковый низкий уровень Т лимфоцитов в пределах 6-7% и различное содержание СД-54+ гемопозітических клеток.

- В медуллобластомах снижено содержание клеток, содержащих Fas рецептор апоптоза, белок Р-53 по сравнению с глиальными опухолями,

которая проявляется в первую очередь устойчивостью к апоптозным регулирующим пролиферацию влиянием.

• В медуллобластомах содержание меньше клеток, имеющих нейрональную адгезивную молекулу, чем в астроцитарных опухолях, что свидетельствует о более высокой миграционной способности медуллобластом.

### **Література**

1. Барышников А.Ю., Шишкина Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. Москва. ЦРСС. 2002.

2. Зозуля Ю.А., Малышева Т.А. Эмбриологические и цитологические предпосылки термина «Глиома». В кн.: Зозуля Ю.А. и др. Глиомы головного мозга. Киев. 2007: 5-18.

3. Ковсан В.М., Дмитренко В.В. Молекулярно-генетические особенности глиом. В кн.: Глиомы головного мозга. Под ред. Ю.П.Зозули. 2007: 41-44.

4. Лисяний Н.И. Иммунология и иммунотерапия злокачественных глиом головного мозга. Киев. 2011.

5. Орлов Ю.А. Комбинированное лечение опухоли головного мозга у детей. Онкология. 2005, 4: 330-335.

6. Пинегин Б.В., Ярилин А.М., Сименова Л.В и др. Применение проточной цитофлуориметрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека (пособие для врачей-лаборантов). Москва. 2001.

7. Разуменко В.Д., Орлов Ю.А. Эпидемиология глиом и факторы риска их развития. В кн.: «Глиомы головного мозга» (под ред. Зозули Ю.А.). К. 2007: 19-34.

8. Graniford J.R., Mac Doneld T., Parker J. Medulloblastome in childhood. Neu Biological Advances. Lancet. Neurol -2007, 6: 1073-1085.

9. Rossi A., Caracciolo V., Russo G. et al. Medulloblastome: From Molecular Pathology to Therapy. Clin. Cancer. Res. 2008, 14 (4): 971-973.

10. Taylor M.D., Northcoft P., Korchucoli A. Remke M. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma^ the current corsenses. Acta Neuropathol. 2012, 123: 465-472.

11. Verhaak R.W., Haadley K.A., Pardon F et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastomas. Cancer Cell. 2010, 17: 99-110.

***Н.І. Лисяний, А.І. Потапова, Л.А.Ком***

**Вивчення фенотипічних характеристик**

**медуллобластом і гліоми головного мозку**

**ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова**

**НАМН України», м. Київ**

**Вступ.** Пропонується використовувати фенотипічні маркери як прогностичні показники.

**Мета.** Вивчити фенотипічні особливості клітин пухлин, отриманих під час нейрохірургічних операцій.

**Матеріали і методи.** Досліджено 37 медуллобластом і 12 астрогліальних пухлин, з яких готували клітинні суспензії і за допомогою панелі з 8 моноклональних антитіл методом проточної лазерної цитофлуориметрії визначали фенотипічні маркери, відповідальні за проліферацію, апоптоз, метастазування.

**Результати.** Встановлено, що медулобластома містять менше ніж астрочити клітин, що експресують онкопротеїнами Р-53, Fas рецептор апоптозу та також нейрональну молекулу адгезії СД-56, що вказує на більш високий онкогенний потенціал цих клітин.

**Ключові слова:** фенотипічні особливості медуллобластома, онкопротеїн Р-53, Fas-рецептор апоптозу.

*A. N. Lisyanyy, A.I. Potapova, L.A. Kot*  
**Studies of phenotypical descriptions of medulloblastom  
and gliomas of brain**

**Acad. A.P. Romodanov SI “Institute of Neurosurgery,  
NAMSc of Ukraine”, Kyiv**

**Purpose.** To study the phenotypical features of tumour cells obtained in neuro-surgical operations.

**Materials and methods.** Investigated were 37 samples of medulloblastoma and 12 samples of astroglial tumours. They were used to make cell suspensions and identify phenotypical markers responsible for proliferation, apoptosis and metastatic dissemination. The identification was performed by running laser cyto-fluorimetry using the panel of 8 monoclonal antibodies.

**Results.** There was found a decreased level of R-53 oncoprotein expressing cells in medulloblastomas, Fas receptor of apoptosis as well as CD-56 neuronal cell adhesion molecule compared with astrocytomas, which is indicative of higher oncogenic potential of these cells.

It is suggested to use the phenotypical markers as prognostic indices.

**Key words:** medulloblastoma, P-53oncoprotein, Fas-receptor apoptosis.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

*Н.И. Лисяный, А.И. Потапова, А.Н. Лисяный,  
А.И. Ключникова, Л.А. Кот*

**СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ПРОСТОГО  
ГЕРПЕСА И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСУ В КРОВИ  
БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.  
Ромоданова НАМН Украины», г.Киев**

**Вступление.** Вирусная инфекция может быть одним из этиологических факторов развития онкологических заболеваний

**Цель.** Сравнить уровень противовирусных антител в крови нейроонкологических и других групп больных.