

УДК 616-006:576.3

ПОПУЛЯЦИЯ КЛЕТОК МЕНИНГИОМ СО СТВОЛОВЫМИ СВОЙСТВАМИ

Никитин П.В., Зубова И.В., Шугай С.В., Галстян С.А., Хохлова Е.А.

*ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко», Москва,
e-mail: redseadog@gmail.com*

Менингиомы встречаются чаще других опухолей центральной нервной системы, представляя собой самую распространенную нозологию среди новообразований данной локализации. Применяемые диагностические подходы недостаточны для надежной дифференциации менингиом разной степени злокачественности. Кроме того, дальнейшего рассмотрения требуют вопросы свойств внутриопухолевой гетерогенности менингиом с выделением различных клеточных популяций, в том числе со стволовыми свойствами. Для решения данной задачи было проведено исследование экспрессии стволового маркера CD 133 с помощью иммуногистохимического метода в менингиомах различной степени злокачественности. В результате было показано, что в менингиомах Grade I (GI) активность экспрессии CD 133 и содержание клеток со стволовыми свойствами самые низкие, при этом в менингиомах Grade II (GII) данные параметры значимо выше, самых высоких значений они достигают в менингиомах Grade III (GIII). Таким образом, активность экспрессии CD 133 возрастает с повышением степени злокачественности менингиомы. Полученные результаты свидетельствуют о потенциально высокой значимости клеток со стволовыми свойствами для прогрессирования и повышения злокачественного потенциала менингиом и могут лечь в основу создания принципиально новых диагностических и лечебных подходов.

Ключевые слова: менингиомы, стволовые клетки, патология, нейроонкология, иммуногистохимия

MENINGIOMA CELLS POPULATION WITH STEM PROPERTIES

Nikitin P.V., Zubova I.V., Shugay S.V., Galstyan S.A., Khokhlova E.A.

Burdenko Neurosurgical Institute, Moscow, e-mail: redseadog@gmail.com

Meningiomas are more common than other tumors of the central nervous system, representing the most common nosology among neoplasms of this localization. The applied diagnostic approaches are not sufficient for reliable differentiation of meningiomas grades. In addition, further consideration is needed about the properties of meningiomas intratumoral heterogeneity with the isolation of various cell populations, including those with stem properties. To solve this problem, we studied the expression of the stem marker CD 133 using the immunohistochemical method in meningiomas of different grades. As a result, it was shown that in meningiomas Grade I (GI), CD 133 expression activity and stem cell content are the lowest, while in meningiomas Grade II (GII) these parameters are significantly higher, it reaches the highest values in meningiomas Grade III (GIII). Thus, the activity of CD 133 expression increases with an increase of grade of meningioma malignancy. The results indicate a potentially high importance of cells with stem properties for the progression and increase of the malignant potential of meningiomas and can underlie the creation of fundamentally new diagnostic and therapeutic approaches.

Keywords: meningioma, stem cells, pathology, neurooncology, immunohistochemistry

Менингиомы – самые часто встречающиеся опухоли центральной нервной системы (ЦНС) [1]. В классификации ВОЗ 2016 г. менингиомы могут соответствовать трем степеням злокачественности, наиболее часто выявляются менингиомы Grade I, обладающие в целом доброкачественным течением и включающие в себя три наиболее частых гистологических подтипа – менинготелиоматозные, фибробластические и смешанные [2]. Менингиомы Grade II преимущественно относятся к атипическим менингиомам, прогноз их, как правило, менее благоприятный – они чаще рецидивируют даже при радикальном хирургическом вмешательстве [2]. Менингиомы Grade III, большая часть которых принадлежит к классу анапластических менингиом, отличаются относительно неблагоприятным прогнозом [2].

Радикальное хирургическое вмешательство позволяет успешно справиться

с большинством менингиом Grade I, тем не менее существуют и исключения. Даже при радикальном хирургическом удалении опухоли 20–25% менингиом Grade I рецидивируют. Кроме того, часть менингиом может в дальнейшем подвергнуться малигнизации с существенным ухудшением прогноза пациентов [3].

На сегодняшний день применяемые диагностические подходы, позволяющие провести надежную оценку свойств опухоли, в случае с менингиомами опираются почти исключительно на гистологические критерии [4]. При этом большая часть данных критериев плохо воспроизводима и дает лишь приблизительное представление о внутренних свойствах опухоли [5]. Вполне возможно, именно поэтому и средств таргетной терапии менингиом на сегодняшний день не существует.

В то же время одним из важнейших аспектов современных исследований опухо-

лей является изучение свойств внутриопухолевой гетерогенности с выделением разнородных популяций клеток с различными молекулярными и функциональными свойствами. Важнейшей подобной популяцией, выделяемой во многих опухолях, являются опухолевые стволовые клетки (ОСК). Наличие камбиальных прогениторных клеток в составе ткани новообразования характерно для карциномы молочной железы [6], карциномы легкого [7], глиобластомы [8]. Более того, показано, что значимость данного вида клеток для злокачественного потенциала опухоли, а также их вклад в прогрессирование новообразования крайне велики. В частности, было выявлено, что ОСК могут не только играть ключевую роль в росте и распространении опухоли, но и обуславливать устойчивость опухоли к применяемым методам химиотерапии и лучевой терапии [9].

Тем не менее вопрос распространенности и роли клеток со стволовыми свойствами в развитии менингиом различной степени злокачественности остается практически неисследованным. В то же время данная проблема крайне важна, так как может помочь лучше понять внутреннюю клеточную иерархию менингиом и получить новые мощные диагностические и лечебные подходы. В рамках данной работы мы решили изучить экспрессию ключевого маркера стволовых свойств клеток CD 133 в менингиомах различной степени злокачественности.

Целью данного исследования явился сравнительный анализ экспрессии маркера ОСК CD 133 в менингиомах Grade I, Grade II и Grade III по классификации ВОЗ с применением иммуногистохимического метода для выявления данного маркера.

Материалы и методы исследования

Общая характеристика исследования

В данное ретроспективное исследование были включены по 30 пациентов с менингиомами Grade I (GI), менингиомами Grade II (GII) и менингиомами Grade III (GIII), прошедшие хирургическое лечение в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» в 2012–2015 гг. Гистопатологический диагноз был подтвержден тремя опытными патологами. При этом средний возраст составлял $62,29 \pm 3,31$ года, соотношение мужчин и женщин 42,22%:57,78%.

Иммуногистохимическое исследование

Проводилось приготовление срезов толщиной 3 мкм из парафиновых блоков с фиксированными в них образцами опухоли.

Далее полученные срезы были депарафинированы ксилолом и повторно гидратированы с помощью различных концентраций этанола, после чего срезы высушивались при 45°C. Далее проводилась последовательная инкубация срезов с кроличьими моноклональными антителами против человеческого антигена CD 133 (ZRB1013, Sigma-Aldrich, США).

Первичный анализ изображений

Затем все препараты были оцифрованы с использованием сканера Aperio 3T (Leica Biosystems, GmbH). Полученные сканированные изображения были проанализированы с помощью программного обеспечения Aperio ImageScope (Leica Biosystems, GmbH), ImageJ (Национальный институт здравоохранения, США) и QuPath (Университет Эдинбурга, Великобритания). Для оценки активности экспрессии CD 133 применялись два подхода. Первый подход включал в себя оценку количественного содержания клеток с позитивной экспрессией CD 133 в процентном отношении к общему количеству клеток в препарате (ПК CD 133). Кроме того, применялся подход с полуколичественной оценкой активности экспрессии CD 133 по типу методики histoscore (histoscore CD 133), для чего процент клеток со слабо положительным окрашиванием (низкая интенсивность экспрессии) умножался на единицу, процент клеток с умеренно положительным окрашиванием (средняя интенсивность экспрессии) умножался на два и, наконец, процент клеток с выраженно положительным окрашиванием (высокая интенсивность экспрессии) умножался на три, после чего результаты суммировались. Цветность меток характеризовалась с применением ранее предложенной нами методики [10].

Статистический анализ

Для проведения статистического анализа применялось программное обеспечение Matlab (The MathWorks, США). Для сравнения средних значений в группах менингиом использовался U-тест Манна–Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Количественное содержание клеток со стволовыми свойствами в менингиомах

При проведении количественной оценки содержания клеток со стволовыми свойствами в менингиомах различной степени злокачественности было выявлено, что в менингиомах GI среднее значение ПК

CD 133 составило $14,26 \pm 2,44\%$, в менингиомах GII данный показатель составил $28,42 \pm 2,34\%$, в менингиомах GIII ПК CD 133 равнялся $46,48 \pm 4,32\%$ (рис. 1). Также было выявлено, что средние значения ПК CD 133 в менингиомах GI статистически значимо различались как с аналогичным показателем в менингиомах GII ($p = 0,001$; $Z = 5,14$), так и в менингиомах GIII ($p < 0,001$; $Z = 5,38$). Кроме того, было показано, что менингиомы GII также значимо отличаются от менингиом GIII ($p = 0,004$; $Z = 5,12$).

Таким образом, наименее выражена количественная составляющая активности экспрессии CD 133 в менингиомах GI, в то время как в менингиомах GII активность экспрессии значимо повышается и достигает максимальных показателей в менингиомах GIII.

Выявление полуколичественным методом активности экспрессии CD 133

При проведении оценки активности экспрессии CD 133 в менингиомах различной степени злокачественности было выявлено, что histoscore CD 133 в менингиомах GI составил в среднем $28,62 \pm 2,44\%$, в менингиомах GII данный параметр составил $48,46 \pm 2,30\%$, в менингиомах GIII он равнялся $68,58 \pm 4,82\%$ (рис. 2). В то же время различия средних значений histoscore CD 133 в менингиомах GI в сравнении с менингиомами GII были значимыми ($p = 0,014$; $Z = 4,84$), также менингиомы GI значимо от-

личались по данному параметру от менингиом GIII ($p < 0,001$; $Z = 5,18$). Наблюдались значимые различия в данном показателе и между менингиомами GII и менингиомами GIII ($p = 0,004$; $Z = 4,88$).

В целом полуколичественный подсчет активности экспрессии CD 133 показал, что наименьшая активность экспрессии данного маркера выявляется в менингиомах GI, при этом она значимо выше в менингиомах GII, самое высокое значение выявляется в менингиомах GIII.

Полученные результаты четко формируют тенденцию в количественном содержании клеток со стволовыми свойствами в менингиомах. В целом наблюдается нарастание количества ОСК при увеличении степени злокачественности опухоли, что подтверждается с помощью двух разных методов оценки активности экспрессии стволового маркера CD 133 в иммуногистохимических препаратах менингиом. Данная закономерность крайне любопытна и хорошо согласуется с общими представлениями о молекулярных функциональных свойствах ОСК. Данный вид клеток вносит значительный вклад в процесс прогрессирования новообразований. Количественное содержание ОСК напрямую взаимосвязано не только со злокачественным потенциалом опухоли в целом, но также, в частности, с резистентностью клеток опухоли к химиотерапии и лучевой терапии.

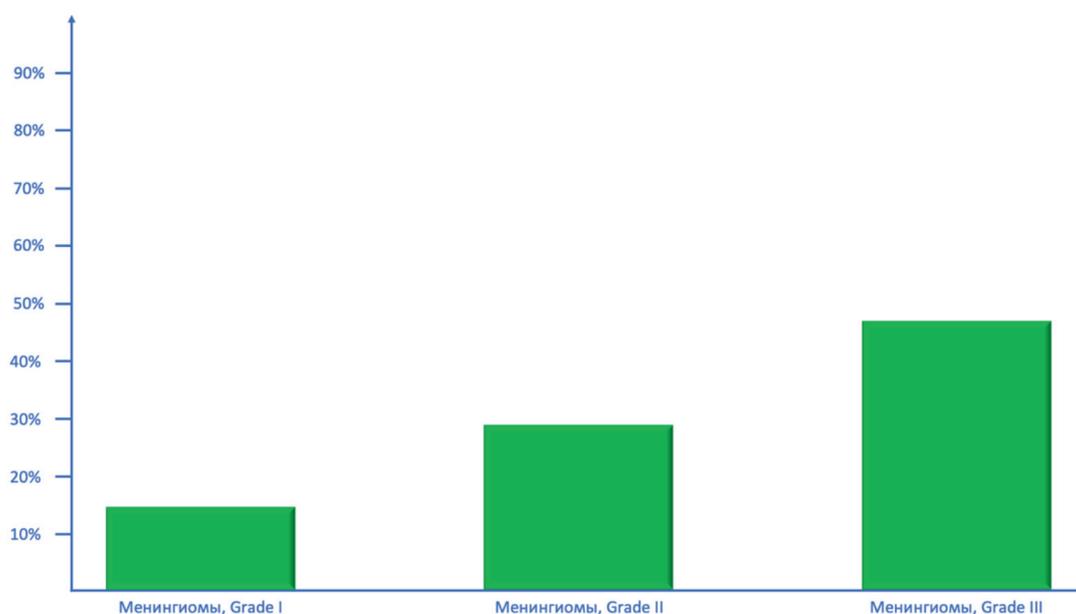


Рис. 1. Выявление активности экспрессии CD 133 в менингиомах различной степени злокачественности, подсчитанной количественным методом

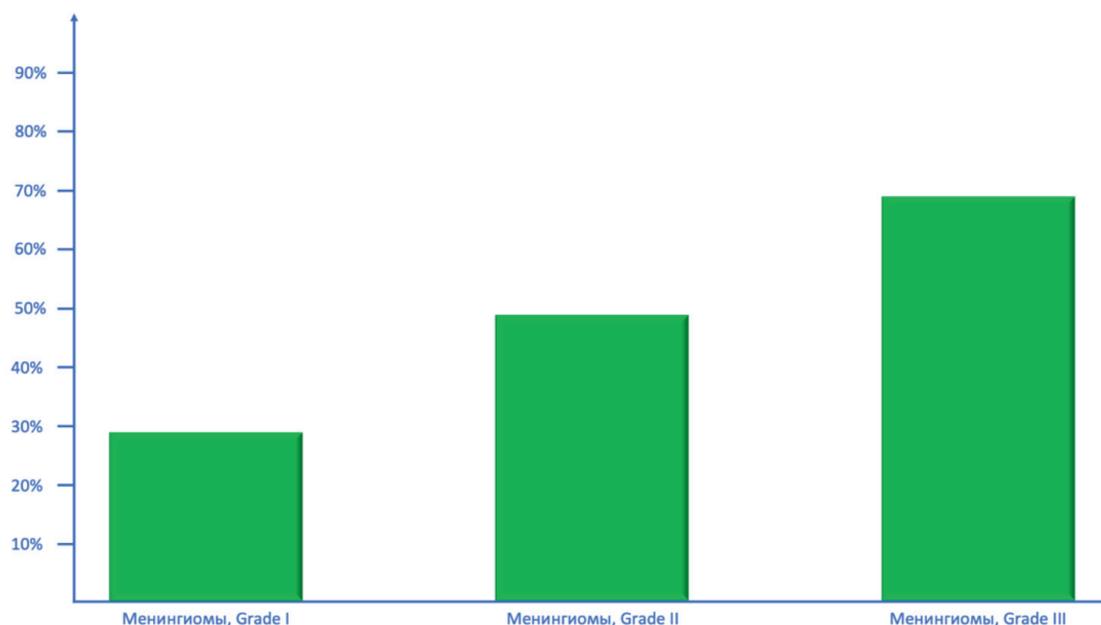


Рис. 2. Выявление активности экспрессии CD 133 в менингиомах различной степени злокачественности, подсчитанной полуколичественным методом

По-видимому, в данном случае более высокое содержание ОСК в атипических и тем более в анапластических менингиомах по крайней мере отчасти может обуславливать их более высокий потенциал прогрессирования и рецидивирования. Однако механизмы такого влияния могут быть разнообразными, поскольку для их аналогов при других опухолевых заболеваниях показано, что ОСК могут не только быть регенераторным пулом для различных клеточных популяций в опухоли, но также отличаются существенно более высокой клеточной пластичностью, что способствует появлению в них повышающих приспособительные возможности свойств. В частности, данная характеристика позволяет ОСК принимать самое активное участие как в формировании лечебной резистентности, так и в обеспечении кровоснабжения опухоли и повышении ее инвазивных свойств.

Поэтому полученные результаты крайне важны и открывают большие перспективы для дальнейших исследований. Для создания современных концепций патогенеза опухолей на фундаментальном уровне необходим дифференцированный подход с характеристикой свойств различных клеточных популяций. В то же время в клинической плоскости такой подход позволит создать принципиально новые средства

прецизионной персонализированной диагностики и таргетного лечения пациентов с онкологическими заболеваниями с учетом всей полноты свойств внутриопухолевой гетерогенности.

Заключение

Таким образом, в представленной работе впервые было показано наличие в менингиомах экспрессии стволового маркера CD 133, причем количественное содержание клеток с наличием данного маркера значимо возрастает с повышением степени злокачественности опухоли. В целом наши данные позволяют заключить, что по своим молекулярным свойствам клетки менингиомы неоднородны и имеют различные молекулярные и функциональные свойства, при этом одной из важных клеточных популяций выступают клетки со стволовыми свойствами. Повышение количественного содержания данных клеток приводит к росту злокачественного потенциала менингиомы. Дальнейшие работы в данном направлении позволят значительно расширить диагностические и терапевтические возможности для данного вида опухолей в рамках концепции персонализированной медицины.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-01214 мк.

Список литературы

1. Ostrom Q.T., Gittleman H., Fulop J., Liu M., Blanda R., Kromer C., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015. vol. 17. P. 1–62.
2. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016. vol. 131 no. 6. P. 803–820.
3. Fountain D.M., Soon W.C., Matys T., Guilfoyle M.R., Kirolos R., Santarius T. Volumetric growth rates of meningioma and its correlation with histological diagnosis and clinical outcome: a systematic review. *Acta Neurochir (Wien).* 2017. vol. 159. no. 3. P. 435–445.
4. Chohan M.O., Ryan C.T., Singh R., Lanning R.M., Reiner A.S., Rosenblum M.K., Tabar V., Gutin P.H. Predictors of Treatment Response and Survival Outcomes in Meningioma Recurrence with Atypical or Anaplastic Histology. *Neurosurgery.* 2018. vol. 82. no. 6. P. 824–832.
5. Perry A., Stafford S.L., Scheithauer B.W., Suman V.J., Lohse C.M. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am. J. Surg. Pathol.* 1997. vol. 21. no. 12. P. 1455–65.
6. Dittmer J. Breast cancer stem cells: Features, key drivers and treatment options. *Semin Cancer Biol.* 2018. vol. 53. P. 59–74.
7. Maiuthed A., Chantarawong W., Chanvorachote P. Lung Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell-targeting Natural Compounds. *Anticancer Res.* 2018. vol. 38. no. 7. P. 3797–3809. DOI: 10.21873/anticancerres.12663.
8. Xu H.S., Qin X.L., Zong H.L., He X.G., Cao L. Cancer stem cell markers in glioblastoma – an update. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2017. vol. 21. no. 14. P. 3207–3211.
9. Zhou P., Li B., Liu F., Zhang M., Wang Q., Liu Y., Yao Y., Li D. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Mol. Cancer.* 2017. vol. 16. no. 1. P. 52.
10. Nikitin P.V., Ryzhova M.V., Shishkina L.V., Shugay S.V., Zubova I.V. Study of Simple Immunohistochemical Cytocolorimetric Assay Application for More Accurate Assessment of Prognosis in Patients with Pituitary Adenomas. *World Neurosurg.* 2019. vol. 122. P. e1047–e1051.