

Emil Zielonka

Received: 27.06.2013

Accepted: 30.07.2013

Published: 31.12.2013

Immunohistochemiczna metoda identyfikacji komórek CD133⁺ w glioblastoma

Immunohistochemical identification methods of CD133⁺ cells in glioblastoma

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Adres do korespondencji: Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 42 675 76 15, 660 725 947, faks: 42 679 14 77, e-mail: emil.zielonka@umed.lodz.pl

Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Najczęstszym i jednocześnie najgorzej rokującym nowotworem pochodzenia astrocytarnego jest *glioblastoma* (IV stopień złośliwości według Światowej Organizacji Zdrowia). Obraz mikroskopowy *glioblastoma* charakteryzuje się atypią komórkową, obecnością ognisk martwicy palisadowej oraz proliferacją drobnych naczyń. Wyróżniamy dwa typy *glioblastoma*: pierwotny i wtórny. Jedną z podstawowych cech histopatologicznych tego nowotworu jest obecność proliferacji naczyń. Proliferacje naczyń *glioblastoma* rozpoznawane są jako wielowarstwowe kłębki rozrośniętych i mitotycznie aktywnych komórek endotelialnych. Komórki macierzyste odgrywają znaczącą rolę w tworzeniu sieci naczyń krwionośnych nowotworu za sprawą różnicowania w kierunku komórek endotelialnych. Za marker nowotworowych komórek macierzystych uważa się antygen CD133. Komórki nowotworu wykazujące ekspresję tego białka rozpoznawane przez odpowiednie przeciwciała zlokalizowane są w niszach otaczających naczynia krwionośne występujące w masie nowotworu. Komórki CD133⁺ występują również w ścianach naczyń krwionośnych. Celem przeprowadzonych badań było opracowanie optymalnej immunohistochemicznej metody barwienia, z wykorzystaniem przeciwciała przeciw CD133, która ułatwi identyfikację komórek macierzystych. Materiał do badań stanowiły preparaty histopatologiczne pobrane do rutynowych badań histopatologicznych w czasie zabiegu operacyjnego z wcześniej rozpoznanymi przypadkami *glioblastoma*. Badania obejmowały różne metody barwień immunohistochemicznych z wykorzystaniem zróżnicowanych sposobów odmaskowywania antygenów, z zastosowaniem odmiennych buforów, systemów detekcyjnych oraz rozcieńczeń przeciwciała i czasów inkubacji preparatów z przeciwciałem. Najlepsze wyniki barwienia immunohistochemicznego otrzymano w preparatach, w których w celu odmaskowywania antygeny zastosowano autoklaw, bufor o pH 9,0 i system detekcyjny LSAB+ System-HRP.

Słowa kluczowe: immunohistochemia, CD133, *glioblastoma*, nowotworowe komórki macierzyste, mikroskopia konfokalna

Summary

Glioblastoma (GBM, WHO grade IV) is the most lethal type of brain tumours. Despite advances in radiotherapy, chemotherapy and surgical techniques, this tumour is still associated with a median overall survival of approximately 1 year. Histopathological features of GBM include nuclear atypia, foci of palisading necrosis, microvascular proliferation and robust mitotic activity. Glioblastoma is one of the best vascularized tumours in humans

and its proliferation is hallmarked by a distinct proliferative vascular component. Studies of glioblastoma's vascularization have cast some light on the role of non-endothelial cells in tumour neoangiogenesis. A characteristic feature of protein CD133 is its rapid down-regulation during cell differentiation, which makes it a unique cell surface marker for identification of stem cells in brain tissue. CD133⁺ tumour cells are located mainly in perivascular niches. CD133 positive cells were also found in blood vessels wall. The aim of this study was to optimize immunohistochemical staining method to facilitate identification of cells recognized by anti-CD133 antibody in paraffin-embedded glioblastoma tissue sections. In this study, several pretreatments, detection systems, dilution of antibody and time incubation were used. Immunohistochemical staining method in which autoclave, a buffer pH 9.0 and LSAB+ System-HRP were used gave the best result.

Key words: immunohistochemistry, CD133, glioblastoma, cancer stem cells, confocal microscopy

WSTĘP

Glioblastoma (GBM) jest najczęściej występującym i zarazem najzłośliwszym nowotworem szeregu astrocytarnego (IV stopień złośliwości według Światowej Organizacji Zdrowia)^(1,2). Mimo rozwoju technik chirurgicznych, radioterapii i chemioterapii średni czas przeżycia pacjentów z GBM wynosi około roku^(3,4). *Glioblastoma* charakteryzuje się atypią komórkową, obecnością ognisk martwicy palisadowej oraz ogniskową proliferacją drobnych naczyń⁽¹⁻³⁾. Rozrosty naczyń krwionośnych GBM tworzą ogniskowe zagęszczenia włóściwe. Zjawisko powstawania rozrostów mikronacyniowych w GBM jest istotną cechą obrazu mikroskopowego tych nowotworów. Mikronaczynia tworzą kłębki, często zlokalizowane w sąsiedztwie martwicy. Obraz histologiczny tych naczyń składa się z wykazujących figury podziału mitotycznego komórek endotelialnych, komórek mięśni gładkich i perycytów⁽²⁾. W trakcie progresji złośliwości nowotworów szeregu astrocytarnego można zaobserwować charakterystyczne zmiany budowy naczyń krwionośnych. Naczynia krwionośne GBM charakteryzują się wysoką proliferacją komórek endotelialnych i chaotycznie rozmieszczonymi perycytami⁽⁵⁾. W obrazie GBM z mikroskopu elektronowego widoczne są bardziej pofałdowane jądra komórkowe oraz inkluzje śródjądrowe⁽¹⁾. Wyróżnia się dwa typy GBM: pierwotny i wtórny, które mimo różnych molekularnych ścieżek patogenetycznych charakteryzują się tym samym obrazem mikroskopowym. Wtórny GBM powstaje w wyniku progresji nowotworów astrocytarnych o niskim stopniu złośliwości (gwiazdziaków o II bądź III stopniu złośliwości)^(2,3). Nowotwór rozwijający się *de novo*, bez dowodów na pochodzenie z nowotworów o niskim stopniu złośliwości i posiadający krótką historię kliniczną (mniej niż trzy miesiące), określane jest jako pierwotny GBM^(2,3). Molekularny mechanizm nowotworzenia GBM związany jest z inaktywacją genów supresorowych lub nadekspresją onkogenów^(1,6). Pierwotny GBM jest szczególnie związany z amplifikacją *EGFR*, delecją genu *p16* i mutacją genu *PTEN*. Wtórny GBM charakteryzuje się mutacją genu *TP53* i nadekspresją *PDGFA*^(1-3,7). *Glioblastoma* jest nowotworem wysoce zależnym od procesu angiogenezy. Wyniki wielu badań wykazały udział nieendotelialnych

komórek pokrywających nowo powstałe naczynia krwionośne. Źródłem nieendotelialnych komórek okazały się najprawdopodobniej nowotworowe komórki macierzyste różnicujące się w trakcie nowotworzenia w komórki mięśni gładkich. Bieżąca hipoteza sugeruje istnienie populacji komórek w nowotworze (nowotworowych komórek macierzystych – *cancer stem cells*, CNC), które posiadają unikalną zdolność do samoodnowy i tym samym podtrzymania wzrostu nowotworu^(8,9). Istotne stało się więc znalezienie markerów charakterystycznych dla nowotworowych komórek macierzystych⁽⁸⁾.

Jednym z najczęściej używanych markerów komórek macierzystych nowotworu jest CD133. CD133 jest transmembranową glikoproteiną występującą w komórkach krwiotwórczych i komórkach progenitorowych neuronów⁽⁸⁾. Charakterystyczną cechą tego białka stanowi zmiana poziomu ekspresji podczas różnicowania komórek. Cecha ta czyni CD133 unikalnym markerem pozwalającym na identyfikację oraz izolację komórek macierzystych i komórek progenitorowych w tkankach mózgu⁽⁹⁾. Tkanki nowotworu w porównaniu z tkankami prawidłowego mózgu charakteryzują się większym udziałem komórek wykazujących immunoekspresję antygeny CD133. Poziom ekspresji tego białka koreluje ze stopniem złośliwości nowotworu^(8,10). Komórki wykazujące immunoekspresję antygeny CD133 zlokalizowane są w szczególności wokół naczyń krwionośnych. Obfitość nisz CD133⁺ rośnie wraz ze stopniem złośliwości nowotworu^(4,8,11). Ocena immunoekspresji antygeny CD133 w GBM może być przydatna do oceny przebiegu procesu angiogenezy naczyń krwionośnych. Dostępne oryginalne publikacje poruszające temat ekspresji markerów komórek macierzystych wykorzystują różne metody barwień immunohistochemicznych z zastosowaniem przeciwciała przeciw CD133. Głównym celem przeprowadzonych badań było przedstawienie i porównanie metod barwień immunohistochemicznych z użyciem przeciwciała przeciw CD133 dających optymalne i jednoznaczne rezultaty widoczne w mikroskopie świetlnym. W celach badawczych wykonano kilka metod barwień z zastosowaniem różnych sposobów odmaskowywania antygenów oraz różnych buforów, rozcieńczeń stosowanego przeciwciała i czasów jego inkubacji, a także różnych systemów detekcyjnych.

Sposób odkrywania antygeny	Czas odkrywania antygeny (min)	Zastosowany bufor	Rozcieńczenie przeciwciała	Czas inkubacji przeciwciała	System detekcyjny
Gotowanie w kuchni mikrofalowej	20	Target Retrieval Solution, Concentrated × 10	1:25–1:200	Noc	EnVision+System-HRP (DAB)
Gotowanie w kuchni mikrofalowej	20	Target Retrieval Solution, pH 9	1:25	Noc	EnVision+System-HRP (DAB)
Gotowanie w kuchni mikrofalowej	20	Target Retrieval Solution, pH 9	1:25	60 min	LSAB+System-HRP
Gotowanie w łaźni wodnej	60	Target Retrieval Solution, pH 9	1:25	60 min	LSAB+System-HRP
Autoklaw	3	Target Retrieval Solution, pH 9	1:25	Noc/60 min	EnVision+System-HRP (DAB)
Autoklaw	3	Target Retrieval Solution, pH 9	1:25	Noc/60 min	LSAB+System-HRP

Tabela 1. Sposób odkrywania antygenów oraz rozcieńczenia przeciwciała i czas jego inkubacji

MATERIAŁ I METODY

Barwienia immunohistochemiczne zostały wykonane na skrawkach parafinowych o grubości 4 μm, które pochodziły z materiału pobranego do rutynowych badań histopatologicznych w czasie zabiegu operacyjnego z wcześniej rozpoznanymi przypadkami GBM. Reakcję immunohistochemiczną przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała przeciw CD133, klon AC133 (Miltenyi Biotec). Przeciwciała przeciw CD133 rozcieńczono z wykorzystaniem rozcieńczalnika Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako). Skrojone fragmenty tkanek przeprowadzono w rutynowy sposób. Odmaskowywania antygenów dokonano, wykorzystując kuchnię mikrofalową (20 min), łaźnię wodną (60 min, 98°C) i autoklaw (3 min, 121°C). Preparaty umieszczono w buforze Target Retrieval Solution, Concentrated × 10 (Dako) lub Target Retrieval Solution, pH 9,0 (Dako). Do wizualizacji antygenów wykorzystano system detekcyjny EnVision+System-HRP (DAB) for use with mouse primary antibodies (Dako) oraz LSAB+System-HRP (Dako). Sposób odmaskowywania antygenów oraz rozcieńczenia przeciwciała i czas inkubacji przedstawiono w tabeli 1. Przeciwciała użyte do mikroskopii konfokalnej rozcieńczono w stosunku 1:250 (GFAP, polyclonal rabbit, Dako) oraz 1:12 (CD133, monoclonal mouse, clone AC133, Miltenyi Biotec). Reakcje immunohistochemiczne przeznaczone do mikroskopii konfokalnej zostały przeprowadzone

Komórki nowotworu	Komórki śródbłonna	
	Rozrosty naczyń	Pojedyncze naczynia
0	0	0
0	0	0
+	0	0
++	+	+
0	0	0
+++	+	+

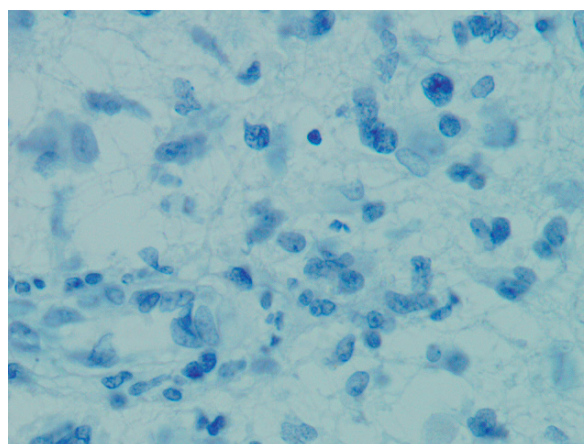
Tabela 2. Wyniki barwień immunohistochemicznych

w podobny sposób do reakcji immunohistochemicznych. Fluorochromami użytymi do immunofluorescencji były: fluorochrom 488 (goat anti-mouse, Invitrogen, rozcieńczenie 1:200) oraz Cy5 (goat anti-rabbit, rozcieńczenie 1:200, Jackson ImmunoResearch). Preparaty z naniesionymi fluorochromami inkubowano przez godzinę w komorze wilgotnej i temperaturze pokojowej. Preparaty po zakończonej reakcji immunohistochemicznej były oceniane w mikroskopie świetlnym metodą półilościową. Do oceny półilościowej zastosowano cztery kategorie nasilenia immunоекспресji antygeny CD133 w komórkach: brak ekspresji (0), słaba ekspresja (+), silna ekspresja (++) i intensywne ekspresja (+++). Stopień przebiegu reakcji immunohistochemicznej w mikroskopie świetlnym został oceniony z użyciem czterokanałowego mikroskopu konfokalnego FluoView 1000, Olympus.

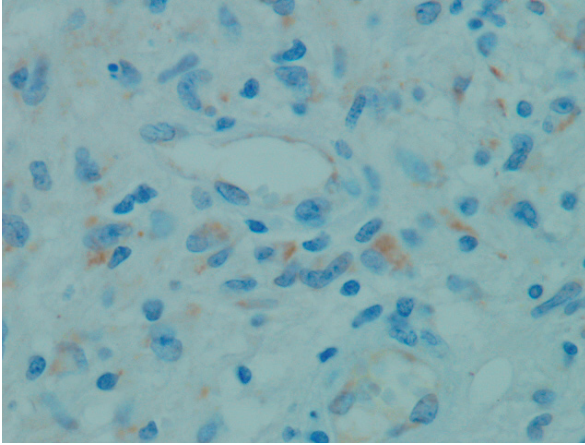
WYNIKI

IMMUNOHISTOCHEMIA

Niezależnie od zastosowanego rozcieńczenia przeciwciała (1:25–1:200) preparaty pochodzące z trzech grup

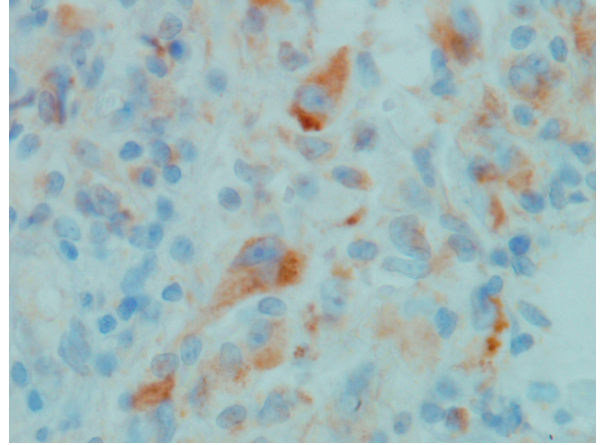


Rys. 1. Ujemny wynik barwienia immunohistochemicznego z zastosowaniem systemu detekcyjnego EnVision+System-HRP (DAB). Powiększenie 400×



Rys. 2. Immunoekspresja CD133 w preparatach gotowanych w kuchni mikrofalowej z użyciem buforu pH 9,0 oraz systemu LSAB+System-HRP. Powiększenie 400×

badanych (tabela 2) charakteryzowały się brakiem ekspresji (0) białka rozpoznawanego przez przeciwciała przeciw CD133 (rys. 1). Ujemny wynik barwienia immunohistochemicznego zanotowano w pojedynczych komórkach nowotworu oraz w komórkach śródbłonna pojedynczych naczyń krwionośnych i ich rozrostach. W dwóch grupach badanych dokonano odmaskowywania antygeny przy użyciu kuchni mikrofalowej (20 min) i buforów o pH 6,0 oraz 9,0. Wizualizacji przeciwciała przeciw CD133 w tych przypadkach dokonano z zastosowaniem systemu EnVision+System-HRP (DAB). Ten sam system detekcyjny został użyty do wizualizacji białka w próbce poddanej autoklawowaniu (temp. 121°C, 3 min) w buforze o pH 9,0. Preparaty, które gotowano w kuchni mikrofalowej w buforze o pH 9,0 i w których użyto przeciwciała rozcieńczonego w proporcjach 1:25 oraz wykorzystano system detekcyjny LSAB+System-HRP, charakteryzowały się bardzo słabą (+) immunoekspresją antygeny CD133 w pojedynczych komórkach nowotworu (rys. 2). W preparatach pochodzących z tej grupy badanej nie zanotowano (0) ekspresji białka w komórkach śródbłonna pojedynczych naczyń oraz rozrostach naczyń. Pojedyncze komórki o stosunkowo silnej immunoekspresji antygeny CD133 (++) zlokalizowane wokół naczyń krwionośnych, były obecne w preparatach gotowanych w łaźni wodnej (60 min) w buforze pH 9,0. W tej metodzie zastosowano również rozcieńczenie przeciwciała 1:25 i system LSAB+System-HRP. Słabszą immunoekspresję antygeny CD133 (+) zanotowano w komórkach śródbłonna pojedynczych naczyń i rozrostach naczyń preparatów barwionych zgodnie z powyższą procedurą. Najlepsze wyniki barwienia immunohistochemicznego otrzymano w preparatach (rys. 3), w których odmaskowywanie antygeny nastąpiło dzięki użyciu autoklawu (temp. 121°C, 3 min) i buforu pH 9,0. Wizualizacji komórek CD133+ dokonano z wykorzystaniem LSAB+System-HRP. Przypadki pochodzące z tej grupy badanej charakteryzowały się intensywną (+++) immunoekspresją antygeny CD133

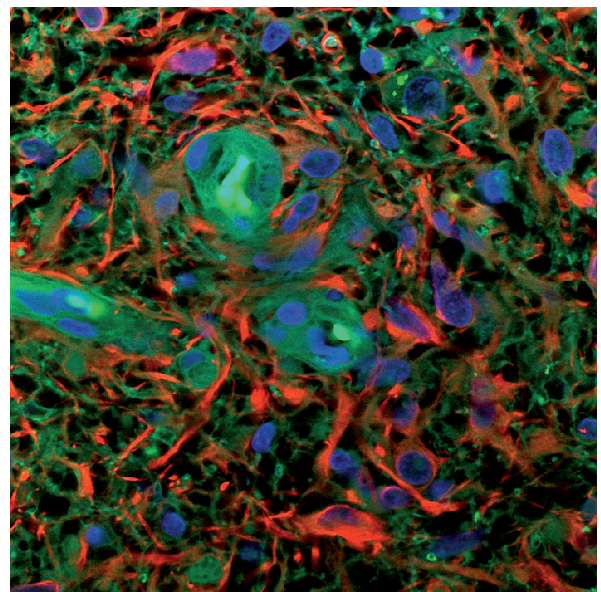


Rys. 3. Immunoekspresja CD133 w preparatach autoklawowanych w buforze pH 9,0 i z wykorzystaniem LSAB+System-HRP. Powiększenie 400×

w pojedynczych komórkach nowotworu, które szczególnie były widoczne wokół naczyń krwionośnych. Słaby (+) odczyn białka rozpoznawanego przez przeciwciała przeciw CD133 odnotowano w komórkach śródbłonna pojedynczych naczyń i rozrostach naczyń. W tej grupie preparaty z przeciwciałem (rozcieńczenie 1:25) inkubowano w 4°C w ciągu nocy i przez 60 minut. W preparatach z przeciwciałem pozostawionym na noc pojawiło się tzw. tło utrudniające właściwą ocenę histopatologiczną preparatów.

LASEROWA MIKROSKOPIA KONFOKALNA

W badanych przypadkach GBM odnotowano trzy populacje komórek. Część komórek wykazywała jedynie immunoekspresję GFAP, inne – CD133. Niewielka liczba komórek wykazywała immunoekspresję obu antygenów (rys. 4).



Rys. 4. Kolokalizacja GFAP (sygnał czerwony) i CD133 (sygnał zielony) w glioblastoma. Powiększenie 400×

OMÓWIENIE

Ferrandina i wsp.⁽¹²⁾ w zaproponowanej metodzie barwienia immunohistochemicznego z użyciem przeciwciała przeciw CD133 (Miltenyi Biotec) wykorzystywali do detekcji komórek system EnVision System-HRP (Dako). Opisana przez autorów metoda barwienia immunohistochemicznego (IHC), w której użyto 20% surowicy koziej, daje pozytywny wynik barwienia. W naszych badaniach ten sam system detekcyjny w żadnej z przeprowadzonych prób barwień nie dał pozytywnego wyniku barwienia widocznego w obrazie mikroskopowym pochodzącym z preparatów z rozpoznaniem GBM. Na wynik nie miały wpływu sposób odmaskowywania antygeny, rodzaj buforu ani rozcieńczenie przeciwciała i jego czas inkubacji z preparatami. Metoda odmaskowywania antygeny przez gotowanie preparatów zanurzonych w buforze pH 6,0 z zastosowaniem kuchni mikrofalowej, a następnie z użyciem LSAB+System-HRP (Dako), którą zaproponowali Thon i wsp.⁽¹¹⁾, daje pozytywny wynik widoczny w postaci komórek CD133⁺ w nowotworach o IV stopniu złośliwości. Podobne warunki barwień (z użyciem innego systemu detekcyjnego), pozwalające na wizualizację komórek CD133⁺ raka żołądka, opisują Yu i wsp.⁽¹³⁾ Odtworzona metoda barwienia zaproponowana przez Thona i wsp.⁽¹¹⁾ z użyciem buforu pH 9,0 daje bardzo słaby (+) odczyn jedynie w pojedynczych komórkach nowotworu. He i wsp.⁽⁴⁾ w procedurze barwienia IHC wykorzystują bufor o pH 5,8, w którym inkubują preparaty w temperaturze 95°C przez pięć minut. Autorzy badań nie wymieniają nazwy użytego systemu detekcyjnego. Preparaty zanurzone w buforze pH 9,0 i autoklawowane w temperaturze 121°C przez trzy minuty, a następnie potraktowane w kolejnych etapach barwienia systemem LSAB+System-HRP charakteryzują się obecnością komórek nowotworu, które wykazują intensywną (+++) immunoekspresję antygeny CD133. W tych preparatach zaobserwowano również CD133⁺ komórki śródbłonna w pojedynczych naczyniach i rozrostach naczyń. Przedstawiona metoda barwienia immunohistochemicznego daje najlepsze wyniki barwień z użyciem przeciwciała przeciw CD133. Podobne warunki barwienia, które zaproponowali Immervoll i wsp.⁽¹⁴⁾, dają pozytywne rezultaty w postaci komórek CD133⁺ w badanych przez autora grupach nowotworów. Opisane w pracach

oryginalnych metody barwień immunohistochemicznych z zastosowaniem przeciwciała przeciw CD133 nie zawsze pozwalają na otrzymanie oczekiwanych rezultatów. Opracowując procedurę barwienia z wykorzystaniem przeciwciała przeciw CD133, należy zwrócić szczególną uwagę na sposób odmaskowywania antygeny, rodzaj użytego buforu oraz systemu detekcyjnego.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Biernat W.: Glejak wielopostaciowy (glioblastoma). W: Liberski P.P., Kozubski W., Biernat W., Kordek R.: Neuroonkologia kliniczna. Czelej, Lublin 2011.
2. Kleihues P., Burger P.C., Aldape K.D. i wsp.: Glioblastoma. W: Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (red.): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon 2007.
3. Miller C.R., Perry A.: Glioblastoma. Arch. Pathol. Lab. Med. 2007; 131: 397–406.
4. He H., Li M.W., Niu C.S.: The pathological characteristics of glioma stem cell niches. J. Clin. Neurosci. 2012; 19: 121–127.
5. Sie M., de Bone E.S., Scherpen F.J. i wsp.: Tumour vasculature and angiogenic profile of paediatric pilocytic astrocytoma; is it much different from glioblastoma? Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2010; 36: 636–647.
6. Kleihues P., Ohgaki H.: Primary and secondary glioblastoma: from concept to clinical diagnosis. Neuro Oncol. 1999; 1: 44–51.
7. DeAngelis L.M.: Brain tumors. N. Engl. J. Med. 2001; 344: 114–123.
8. Dahlrot R.H., Hermansen S.K., Hansen S., Kristensen B.W.: What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2013; 6: 334–348.
9. Cheng J.X., Liu B.L., Zhang X.: How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? Cancer Treat. Rev. 2009; 35: 403–408.
10. Ma Y.H., Mentlein R., Knerlich F. i wsp.: Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. J. Neurooncol. 2008; 86: 31–45.
11. Thon N., Damianoff K., Hegermann J. i wsp.: Presence of pluripotent CD133⁺ cells correlates with malignancy of gliomas. Mol. Cell. Neurosci. 2010; 43: 51–59.
12. Ferrandina G., Martinelli E., Petrillo M. i wsp.: CD133 antigen expression in ovarian cancer. BMC Cancer 2009; 9: 221.
13. Yu J.W., Zhang P., Wu J.G. i wsp.: Expressions and clinical significances of CD133 protein and CD133 mRNA in primary lesion of gastric adenocarcinoma. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2010; 29: 141.
14. Immervoll H., Hoem D., Sakariassen P.Ø. i wsp.: Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. BMC Cancer 2008; 8: 48.