

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

МИЩЕНКО ПОЛИНА ВИКТОРОВНА

**ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ГЛИОБЛАСТОМЫ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор
Хотимченко Юрий Степанович

Владивосток – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Список условных сокращений и обозначений.....	5
Введение.....	6
Обзор литературы.....	12
1.1. Глиальные опухоли центральной нервной системы: современное состояние проблемы.....	13
1.2. Принципы лечения глиальных опухолей нервной системы...	17
1.3. Существующие теории канцерогенеза.....	20
1.4. Опухолевые стволовые клетки (ОСК).....	26
1.5. Миграция стволовых клеток.....	28
1.6. Существующие подходы к применению стволовых клеток в онкологии.....	32
2. Материалы и методы.....	41
2.1. Клеточные культуры.....	41
2.2. Флуоресцентные красители.....	46
2.3. Проточная цитофлуориметрия.....	48
2.4. Иммуноцитохимическое исследование.....	49
2.5. Моделирование опухоли головного мозга.....	50
2.6. Исследование функционального статуса крыс.....	51
2.7. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование.....	53
2.8. Эксперимент по взаимодействию стволовых и опухолевых клеток <i>in vitro</i>	54
2.9. Эксперимент <i>in vivo</i>	55
3. Результаты.....	58
3.1. Антипролиферативный эффект гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы C6 <i>in vitro</i>	58
3.2. Особенности антипролиферативного действия гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы C6 <i>in</i>	

<i>vitro</i>	60
3.3. Экспериментальная модель злокачественной глиальной опухоли головного мозга <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	66
3.3.1. Морфологическая характеристика модели <i>in vitro</i>	66
3.3.2. Иммуноцитохимическая характеристика модели <i>in vitro</i>	67
3.3.3. Клинико-функциональная характеристика модели <i>in vivo</i> ...	73
3.3.4. Гистологическая и иммуногистохимическая характеристика модели <i>in vivo</i>	76
3.4. Оценка эффективности гемопоэтических стволовых клеток до и после применения химиотерапии.....	85
3.4.1. Феномен направленной миграции ГСК к глиоме головного мозга крыс.....	85
3.4.2. Оценка эффективности гемопоэтических стволовых клеток при введении в организм животных с глиомой С6 после системного применения химиотерапевтического препарата темозоломид.....	89
4. Обсуждение.....	95
4.1. Антипролиферативный потенциал гемопоэтических стволовых клеток на модели глиомы линии С6 <i>in vitro</i>	95
4.2. Особенности антипролиферативного эффекта гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы С6 <i>in vitro</i>	97
4.3. Характеристика экспериментальной модели мультиформной глиобластомы <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	99
4.3.1. Морфологическая и иммуноцитохимическая характеристика модели <i>in vitro</i>	99
4.3.2. Клинико-функциональная характеристика модели <i>in vivo</i>	101
4.3.3. Гистологическая и иммуногистохимическая характеристика модели <i>in vivo</i>	103

4.4.Противоопухолевый потенциал гемопоэтических стволовых клеток <i>in vivo</i> у животных с глиомой линии С6 до и после экспериментальной химиотерапии.....	106
4.4.1. Феномен направленной миграции ГСК к глиоме в головного мозга крыс.....	106
4.4.2.Оценка эффективности гемопоэтических стволовых клеток при введении в организм животных с глиомой С6 после системного применения химиотерапевтического препарата темозоломид.....	109
Заключение.....	113
Выводы.....	118
Список литературы.....	119

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГО	Глиальные опухоли
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
НСК	Нейральные стволовые клетки
ОСК	Опухолевые стволовые клетки
ОК	Опухолевые клетки
МРТ	Магнитно-резонансная томография
ГЭБ	Гематоэнцефалический барьер
ГСК	Гемопоэтические стволовые клетки
СК	Стволовые клетки
МГБ	Мультиформная глиобластома
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal bovine serum
ЭСК	Эмбриональные стволовые клетки
ММСК	Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки
EGF	Epidermal growth factor
FGF- β	Basic fibroblast growth factor
БСА	Бычий сывороточный альбумин
PBS	Phosphate buffered saline
ФБС	Фибробласты
ККМ	Красный костный мозг
ЦНС	Центральная нервная система
CFDA SE	Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Мультиформная глиобластома, или астрацитомы IV степени злокачественности по классификации ВОЗ является наиболее распространенной, первичной, высоко инвазивной глиальной опухолью головного мозга человека (Carlsson et al., 2014; Omuro et al., 2014; Frosina, 2015; Siegel et al., 2015) с крайне неблагоприятным прогнозом. Выживаемость больных при условии выполнения всех современных протоколов комплексного лечения составляет 6-12 мес (Vredenburg et al., 2009; Arko et al., 2010; Frosina, 2015). Наряду с запоздалой диагностикой и отсутствием специфических диагностических маркеров, высокая пролиферативная активность и выраженная инфильтрация паренхимы мозга опухолевыми клетками в процессе инвазивного роста мультиформной глиобластомы являются главными причинами смерти этой категории больных (Carlsson et al., 2014).

В последние годы процессы инвазивного роста мультиформной глиобластомы связывают с опухолевыми стволовыми клетками, представляющими особую группу клеток опухоли (Bjerkvig et al, 2005; Bomken et al., 2010; Cheng et al, 2011; Clevers, 2011). Данный тип клеток был впервые идентифицирован при лейкозах и солидных опухолях (Sullivan et al., 2010). Важнейшей особенностью опухолевых стволовых клеток является способность восстанавливать ДНК, поврежденную воздействием облучения и химиотерапии (Bomken et al., 2010; Vinogradov, Wei, 2012). Клетки этого типа обладают мультипотентностью, способностью к самостоятельной миграции и имеют крайне высокий пролиферативный потенциал (Bu, Cao, 2012; Neryanto et al., 2015).

Опухолевые стволовые клетки представлены крайне неоднородной популяцией, именно поэтому лекарств и технологий, способных эффективно убивать этот тип клеток, практически не существует (Huang et al., 2010; Fabian et al., 2013). Поиск путей и механизмов, способных донести

терапевтическое воздействие до молекулярных мишеней, свойственных данному типу клеток, является одним из магистральных направлений исследовательских изысканий в биологии и медицине (Frank et al., 2010; Hossein et al., 2011; Palmer et al., 2011; Hua et al., 2013).

В этом ключе особые перспективы связаны с терапевтическим применением аутологических стволовых клеток (Petrosiute et al., 2012). Среди потенциальных механизмов противоопухолевого действия стволовых клеток в литературе описан феномен их направленной миграции в неопластический очаг (Kim et al., 2010), арест цикла опухолевых клеток в фазе G1, подавление неопластического ангиогенеза, усиление воспалительной реакции и непосредственный запуск апоптоза (Kucerova et al., 2010; Калинина и др., 2011). Применение стволовых клеток в комплексном лечении мультиформной глиобластомы может существенно снизить токсичность химиотерапии, донести терапевтический сигнал до опухолевых клеток, инфильтрирующих паренхиму мозга и воздействовать на опухолевые стволовые клетки (Porada, Almeida-Porada, 2010; Tan et al., 2014; Tran, Damaser, 2015).

Внедрение биомедицинских клеточных технологий в протоколы комплексного лечения мультиформной глиобластомы требует всесторонней оценки противоопухолевого потенциала тканеспецифических стволовых клеток на моделях инвазивных глиальных злокачественных новообразований. Это позволит установить важные закономерности, идентифицировать ключевые особенности и определить принципиальные направления модификации стволовых клеток для повышения эффективности существующих схем лечения мультиформной глиобластомы.

Цель настоящей работы: изучить антипролиферативный потенциал гемопоэтических стволовых клеток и показать эффективность их трансплантации на модели экспериментальной глиобластомы.

Задачи:

1. Изучить антипролиферативный эффект гемопоэтических CD34+ стволовых клеток в отношении клеток глиомы С6 *in vitro*;
2. Проанализировать процесс взаимодействия гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток глиомы С6 *in vitro*;
3. На модели экспериментальной глиобластомы изучить выживаемость и функциональный статус крыс с глиомой С6 после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток;
4. Исследовать противоопухолевый эффект гемопоэтических стволовых клеток у животных с глиомой С6 при их комбинированном введении с химиопрепаратом темозоломид.

Научная новизна. Установлено, что клетки глиомы линии С6 обладают иммуноцитохимическими признаками опухолевых стволовых клеток. Исследован противоопухолевый потенциал гемопоэтических CD34+ стволовых клеток человека на экспериментальной модели мультиформной глиобластомы. Установлено *in vitro*, что антипролиферативный эффект гемопоэтических CD34+ стволовых клеток в отношении клеток глиомы достигает максимума по мере увеличения числа стволовых клеток. Показано, что при совместном культивировании при изначальном соотношении гемопоэтических стволовых и опухолевых клеток глиомы С6 1:1 в процессе их взаимодействия происходит обмен цитоплазматическими белками, в процессе которого количество гемопоэтических стволовых клеток уменьшается. Показано, что трансплантация гемопоэтических CD34+ стволовых клеток экспериментальным животным с глиомой С6 улучшает их функциональный статус. Установлено, что трансплантация гемопоэтических CD34+ стволовых клеток лабораторным крысам с глиобластомой улучшает их функциональное состояние и увеличивает выживаемость после экспериментальной химиотерапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные по изучению взаимодействия гемопозитических стволовых и опухолевых клеток глиомы С6 важны для понимания роли стволовых клеток в процессах канцерогенеза. Доказана прямая связь между числом стволовых клеток в зоне неоплазии и темпами прогрессирования злокачественных новообразований. Доказано, что применение стволовых клеток после курса химиотерапии темозоломидом замедляет темпы прогрессирования опухоли и увеличивает продолжительность жизни лабораторных животных. Работа позволяет экспериментально обосновать возможность направленной миграции стволовых клеток в опухолевый очаг. По результатам проведенной работы созданы теоретические предпосылки для разработки новых молекулярно-биологических подходов к терапии мультиформной глиобластомы.

Методология и методы диссертационного исследования.

В данной работе были применены методы культивирования клеток взрослых млекопитающих. Для прижизненного отслеживания клеток в *in vitro* и *in vivo* в экспериментах применялся метод окраски живых клеток флуоресцентными красителями, методы проточной цитофлуориметрии, непрерывного мониторинга состояния клеточных культур, иммуноцитохимического исследования. Опухоли головного мозга были созданы при помощи экспериментальной стереотаксической хирургии с последующим их определением МРТ-диагностикой и общеморфологическом и иммуногистохимическом исследовании. Изучение влияния стволовых клеток на опухолевые процессы, выживаемость и объемы опухолевых узлов у животных в сочетании с экспериментальной химиотерапией проводили с исследованием функционального статуса экспериментальных животных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Нативные гемопозитические стволовые клетки обладают выраженным противоопухолевым потенциалом.

2. Противоопухолевая эффективность гемопоэтических стволовых клеток достигает максимума после применения цитостатических противоопухолевых препаратов.

Степень достоверности результатов. Фактические материалы, представленные в диссертации полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований. Достоверность полученных результатов и выводов основывается на достаточном объеме выборки и статистической обработке с расчетом стандартного отклонения и критерия достоверности, использовании современных методов исследования, корректном анализе полученных данных.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на I Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 4-6 декабря 2013 г); XII Всероссийской научно-практической конференции Отечественные противоопухолевые препараты (Москва 31 марта – 1 апреля, 2015 г); на ежегодных научных конференциях Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, 2014 г, 2015 г).

Публикации. Основные результаты работы опубликованы в виде 9 статей, 8 из них в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа представлена в виде 147 страниц машинописного текста, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», заключения и выводов. В работе 26 рисунков и 5 таблиц. Список литературы содержит 250 источников.

Личный вклад автора: Экспериментальная часть работы была выполнена соискателем самостоятельно. Соискатель непосредственно участвовал в анализе и интерпретации полученных результатов, в представлении результатов на конференциях и подготовке публикаций по результатам исследований.

Благодарности. Автор выражает благодарность сотрудникам кафедры «Клеточной биологии и генетики» Школы естественных наук ДВФУ, сотрудникам «Клиники восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (г. Москва), сотрудникам Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина, сотрудникам ООО «Инновационный медицинский центр» (г. Черкесск) за методологическую помощь и продуктивное научное сотрудничество.

Финансирование Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации – проект №14.575.21.0038 (уникальный идентификатор проекта RFMEF157514X0038).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Онкологические заболевания являются одной из ведущих причин смертности населения в большинстве экономически развитых стран мира (Siegel et al., 2015; Torre et al., 2015). Согласно данным официальной статистики в общей структуре онкологической заболеваемости опухоли ЦНС составляют 1,5-2,5% всех новообразований и являются причиной смерти 2,3-3,5% онкологических больных (Siegel et al., 2015; Torre et al., 2015). В свою очередь, среди первичных опухолей ЦНС самый большой класс составляют глиомы – гетерогенная группа новообразований из нейроэпителиальной ткани (Arko et al., 2010; Fonseca, Badie, 2013). Частота первичных опухолей ЦНС составляет от 4,5 на 100 000 населения в год (Корниенко, 2004). В странах Европы и Америки они встречаются с частотой 7,2-14,1 на 100 000 населения. В США ежегодно регистрируется 17 тысяч новых случаев глиальных опухолей, преимущественно среди белого населения (Omuro, DeAngelis, 2013). От 52 до 80% глиальных опухолей представлены мультиформной глиобластомой – агрессивной злокачественной опухолью с крайне неблагоприятным прогнозом. Традиционным подходом к лечению глиальных опухолей является хирургическая операция с последующим облучением и химиотерапией (Arko et al., 2010; Carlsson et al., 2014). Медиана выживаемости больных при условии выполнения всех современных протоколов комплексного лечения составляет 12-15 месяцев с момента постановки диагноза. Одним из путей повышения эффективности лечения глиом является создание биопрепаратов на основе СК больного или гаплоидентичного родственника (Auffinger et al., 2013; Chopra et al., 2013; Figueiró et al., 2013).

В данном обзоре проведен анализ современного состояния проблемы глиом, проанализированы основные молекулярно-биологические подходы к лечению глиальных новообразований, описаны современные теории канцерогенеза и дано понятие об опухолевых стволовых клетках, описано

понятие миграции стволовых клеток, рассмотрены существующие подходы к применению стволовых клеток в онкологии.

1.1. Глиальные опухоли центральной нервной системы: современное состояние проблемы

Глиальные клетки – наиболее распространенный тип клеток в головном мозге. Они составляют от 40 до 90% объема клеток головного мозга млекопитающих и человека. Количество глиальных клеток в среднем в 10 – 50 раз больше, чем нейронов (Jessen, 2004; Batista, 2014). Глиальные клетки имеют общие функции и, частично, происхождение, кроме микроглии. Глиоциты составляют специфическое микроокружение для нейронов, обеспечивая условия для генерации и передачи нервных импульсов, а также осуществляя часть метаболических процессов самого нейрона (Batista, 2014). Нейроглия выполняет опорную, трофическую, секреторную, разграничительную и защитную функции. К глиоцитам относят астроциты, олигодендроциты и эпендимоциты.

Глиомы – опухоли, входящие в гетерогенную группу новообразований, имеющих нейроэктодермальное происхождение. Глиомы – это самые распространённые первичные опухоли головного мозга (De Almeida et al., 2012). Они различаются по степени злокачественности, гистологическим признакам, способности к инвазии и опухолевому прогрессу. Вопрос о клетках-предшественниках глиом до сих пор является предметом дискуссий (Huang et al., 2010; Lathia et al., 2011; Liu et al., 2011).

Классически, принято считать, что астроцитарные опухоли развиваются из астроцитарного ростка, а олигодендроглиомы из олигодендроглиального ростка. Однако ряд современных исследователей считает, что в основе происхождения глиом лежит «закон злокачественной уязвимости», то есть глиомы развиваются не из зрелых клеток нейроглии, а из медленно пролиферирующих клеток, в которых и происходит злокачественное перерождение (Bjerkvig et al., 2005; Albesiano et al., 2010;

Sukhdeo et al., 2011; De Almeida et al., 2012). При этом направление опухолевой прогрессии (астроцитомы или олигодендроглиомы) определяется наличием различных генетических нарушений (Dougherty et al., 2012; Fabian et al., 2013).

Спектр генетических нарушений характерных для глиальных опухолей хорошо известен. Наиболее часто глиальные опухоли содержат мутации генов p53, EGFR, PTEN, VHL, NF1, NF2, CDH1, APC, CTNNB1, SMO, PTCH, семейства генов CDKN и IDH (Wang et al., 2009; Yamadas et al., 2012; Zhou et al., 2012). Наиболее типичными для глиальных опухолей являются следующие формы патологии генома: в 30-40% глиом выявлены мутации гена p53, локализуемого на коротком плече 17 хромосомы. Мутация проявляется в виде полной потери генетического материала в следствие делеции плеча, либо в виде полной перегруппировки эксонной последовательности гена (Jin et al., 2000); в 60-70 % глиальных опухолей обнаружена амплификация c-erb-1, кодирующего синтез рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) (Hamerlik, 2012). В большинстве случаев эту мутацию сопровождает делеция хромосом десятой пары, что характерно именно для глиом высокой степени злокачественности.

Наиболее часто в глиальных опухолях изменена экспрессия генов PDGF- α и PTEN. Эти гены играют принципиально важную роль в ангиогенезе, необходимом для развития и поддержания опухоли (Nazarenko et al., 2012).

В свою очередь, семейство протеинкиназ В (РКВ) человека включает в себя три внутриклеточных белка, кодируемых генами АКТ1, АКТ2, АКТ3. РКВ присоединяют к цитозольным белкам остатки фосфорной кислоты, регулируя их активность. Белки семейства РКВ играют важную роль в регуляции клеточного цикла, апоптоза, метаболизма глюкозы и в ангиогенезе (Soung, 2006). Одновременная активация Ras и Akt запускает образование опухоли.

Существенная роль в прогрессировании глиальных опухолей, преимущественно глиобластом, принадлежит гену NGF. Концентрация продукта экспрессии этого гена в тканях глиом высокой степени злокачественности почти в три раза выше, чем в нормальном мозге, что является одним из важнейших маркеров агрессивного фенотипа (Mimura et al., 2011). NGF является одним из ключевых лигандов, предотвращающих апоптоз, а другие представители этого семейства (нейротрофический фактор головного мозга, нейротрофин-3 и нейротрофин 4/5) модулируют процессы выживания опухолевых клеток, создания неопластической нервной сети и раковую боль (Vanhecke et al., 2011).

Гены семейства HIF – маркеры особо агрессивного фенотипа глиом, гиперэкспрессируют группу белков HIF (факторы, индуцированные гипоксией), которые являются мощными факторами, активизирующими продукцию большинства генов, в числе которых гены VEGF, моделирующие процессы роста кровеносных сосудов (Kaur et al., 2005). Не менее важна роль микроРНК в процессах эпигенетической регуляции экспрессии генов в клетках глиальных опухолей (Nikaki et al., 2012; Mengfeng et al., 2013; Moller et al., 2013).

Риск развития глиом существенно выше у людей с наследственными генетическими синдромами Коудена, Теркота, нейрофиброматозе I и II типа, семейным шваноматозом, туберозным склерозом, астмой, сенной лихорадкой, экземой (Reilly, 2009; Lodish, Stratakis, 2010; Tabouret et al., 2013). Согласно данным эпидемиологических исследований, риск развития глиальных опухолей повышен у патологоанатомов, судебных медиков, специалистов по бальзамированию, пожарных и фермеров, лиц находящихся в производственном контакте с пластиком, резиной, соединениями мышьяка и ртути, нефтепродуктами и свинцом (Bondy et al., 2008; Ohgaki, 2009).

Описаны корреляции между избыточным потреблением вареной ветчины и жареного бекона, пищи, богатой нитратами, и риском развития глиальных опухолей (Terry et al., 2009; Sheweita, Sheikh, 2011). Облучение

головного мозга приводит к 22-кратному увеличению риска развития глиом и примитивных нейроэктодермальных опухолей мозга. К числу факторов риска следует отнести рентгенотерапию и проживание в местности с повышенным радиационным фоном. Обсуждается роль электромагнитного излучения GSM-диапазона (Bajinskis et al., 2011).

Клиническая картина зависит от локализации опухоли, стадии процесса, выраженности отека вещества мозга. Наиболее ранними клиническими признаками глиом являются эпилептические припадки и головная боль, вызванная стойким повышением внутричерепного давления (Zong et al., 2012; Omuro et al., 2013). По мере прогрессирования болезни, картину дополняют парезы, параличи и другие очаговые неврологические симптомы, вызванные поражением вещества мозга, дислокацией мозговых структур или развитием сосудистых нарушений.

Наиболее информативным методом диагностики является магнитно-резонансная томография головного мозга с контрастным усилением (Henson et al., 2005; Chang, Narayana, 2010; Upadhyay, Waldman, 2011).

На сегодняшний день, критерий злокачественности служит главной системообразующей единицей при построении классификации опухолей мозга (Zacharaki et al., 2009; Pollo, 2012). Гистологическая градация четко коррелирует с определенным типом клинического поведения, степенью положительного ответа на хирургическое лечение, облучение и классические схемы противоопухолевой терапии.

Первой степени злокачественности (Grade I) соответствуют опухоли с низким инвазивным потенциалом и выживаемостью больного более 5 лет. Второй степени злокачественности (Grade II) соответствуют инфильтративные глиомы, которые часто рецидивируют после удаления и характеризуются выживаемостью пациента менее 5 лет. Третья степень злокачественности (Grade III) сочетает атипичию клеточных ядер с высокой митотической активностью, высокой резистентностью к лечению и выживаемостью больных 2-3 года. Четвертая степень злокачественности

(Grade IV) сочетает в себе все перечисленные признаки, но отличается наличием большого числа некрозов (Louis et al., 2001; Kim et al., 2012; Louis et al., 2014). Медиана выживаемости больных составляет 12-14 месяцев.

Мультиформная глиобластома (МГБ) или астроцитомы IV степени злокачественности составляет до 80 % всех первичных опухолей головного мозга. По происхождению они могут быть как первичными опухолями, так и развиться из астроцитомы более низкой степени злокачественности. Такие МГБ считаются вторичными опухолями (Ohgaki, Kleihues, 2013). Первичные опухоли встречаются почти исключительно у пожилых людей, напротив, вторичные формы МГБ характерны для молодых пациентов.

1.2. Принципы лечения глиальных опухолей нервной системы

Современный стандарт лечения глиальных опухолей содержит набор унифицированных лечебных процедур: радикальное удаление опухоли мозга, радиотерапия и системная химиотерапия (Vredenburgh et al., 2009; Chamberlain, 2011; Narita, 2013; Tobias et al., 2013; Carlsson, 2014). При наличии роста опухоли рекомендовано ее повторное удаление, применение радиотерапии или радиохирургии, либо продолжение химиотерапии, если радиотерапия не возможна.

Радикальное удаление опухоли рекомендовано при большинстве видов и локализаций глиом (Souweidane, Luther, 2006; Sanai, Berger, 2008; Cabrera et al., 2011; Chiou, 2013). Хирургическая резекция приводит к одномоментному удалению большого количества ОК, включая терапевтически резистентные клоны, способствует уменьшению внутричерепного давления. Кроме того, расширенное оперативное вмешательство сопровождается выраженным нарушением целостности гематоэнцефалического барьера, что облегчает проникновение химиотерапевтических агентов к месту их непосредственного воздействия. Одномоментное удаление большой массы ОК активирует у оставшихся клеточных пулов пролиферативные процессы, что делает их более чувствительными к терапевтическому воздействию, эффект которого

максимально выражен для клеток, находящихся в митотическом цикле (Kotecha et al., 2012; Chowdhary et al., 2015).

Локализация опухоли в глубине вещества мозга или поблизости от жизненно важных центров мозгового ствола вообще исключает операцию. Характерное для глиом высокой степени злокачественности отсутствие резких границ между тканью опухоли и веществом мозга и выраженная инфильтрация вещества мозга неопластическими клетками препятствует удалению всех ОК, что служит причиной рецидива и роста опухоли (Iwamoto et al., 2009; Gil-Gil et al., 2013; Sherriff et al., 2013).

Наиболее эффективным методом лечения больных с МГБ считается сочетание хирургической операции с облучением (Nieder et al., 2004; Shirai, Chakravarti, 2011; Arvold, Reardon, 2014). Основной эффект ионизирующего излучения на клеточном уровне связан с развитием повреждений молекулы ДНК электронами и свободными радикалами, которые образуются при взаимодействии рентгеновского облучения и гамма-фотонного облучения с молекулой воды (Rivera et al., 2013). Главной причиной радиорезистентности глиом является гипоксическая природа этих опухолей и высокое число ОСК (Yang et al., 2012; Hsieh et al., 2015). Напряжение кислорода в ткани опухоли значительно ниже, чем в окружающем мозговом веществе, что минимизирует терапевтический эффект.

Принято считать, что химиотерапия в сочетании с операцией и облучением увеличивает длительность безрецидивного периода. Наиболее востребованными препаратами для терапии глиальных опухолей являются темозоломид, прокарбазин, ломустин, кармустин, нимустин, фотемустин, дакарбазин, иринотекан, этопозид, винкрестин, цисплатин, карбоплатин, паклитаксел (Schor, 2009; Mierzwa et al., 2010; Philip-Ephraim et al., 2012). Недостатком этих препаратов является ограниченная способность подавлять интерфазные ОК.

Определенные надежды возлагаются на таргетные химиопрепараты и новые фармакогеномные технологии. Предложены методики таргетной

доставки в ОК гена p53 и технологии направленного введения микроРНК (Mir-34a) для запуска апоптоза, исключая p53-опосредованный механизм (Bader, 2012; Yamadas et al., 2012; Misso et al., 2014). Одним из первых препаратов, направленных против EGFR, стал гефитиниб (Uhm et al., 2011), не менее перспективны другие ингибиторы тирозинкиназы – эрлотиниб и лапатиниб, иматиниб тандутиниб и сунитиниб (Arko et al., 2010; Timotheadou, 2011). Предложен ряд препаратов, воздействующих на процессы эпигенетической регуляции экспрессии генов: вориностат, ромидеписин, азацитидин и децитабин (Boumber, Issa, 2011).

Согласно литературным данным противоопухолевая иммунотерапия при использовании дендритных клеток, основанная на приобретении иммунитета против опухоли собственными клетками организма способна увеличить продолжительность жизни больного с глиомами (Pellegatta, Finocchiaro, 2009; Van et al., 2009; Shah et al., 2013). Вся современная иммунотерапия пытается усилить иммунный ответ организма пациента. Активация NK клеток, Т-клеток, макрофагов, иммунизация В-клеток являются отработанными методами воздействия при лечении глиом. Преимущество иммунотерапии заключается в возможности подавления пролиферации ОК без подавления пролиферации нормальных клеток, что делает возможным контроль над числом ОК в организме (Yamanaka et al., 2005; Van et al., 2009; Shah et al., 2013).

Очень перспективным направлением иммунотерапии в нейроонкологии считаются работы в области нацеленного использования иммунной реакции «трансплантат против опухоли», когда трансплантированные иммунные клетки распознают хозяина как чужого и уничтожают его клетки. (Sinkovics, 2010; Petrosiute et al., 2012; Ampie et al., 2015). Иммунотерапия позволила добиться позитивного клинического эффекта, однако это существенно не сказалось на выживаемости нейроонкологических пациентов.

Таким образом, глиальные опухоли представляют собой одну из самых сложных проблем медицины. В последние годы наши знания об этиологии и

патогенезе глиом существенно расширились, обогатившись данными иммуногистохимического анализа, профилем геномных нарушений, эпигенетических расстройств, спектром экспрессируемых опухолью цитокинов. Однако совершенствование методов диагностики и появление магнитно-резонансной томографии принципиально не изменили показатели выживаемости больных с глиомами. Современные технологии ограниченно эффективны против ОСК – главной причины резистентности злокачественных глиальных опухолей.

1.3. Существующие теории канцерогенеза

Проблема возникновения злокачественных опухолей на сегодняшний день не имеет системного решения. Одна из причин подобной ситуации заключается в отсутствии единого представления о причинах и механизмах развития онкологических заболеваний. Единственным научным фактом, не вызывающим возражений, является теория канцерогенов и их роль в происхождении злокачественных новообразований (Comings, 1973; Sonnenschein, Soto, 2008;). Под канцерогенами понимается набор внешних влияний или воздействий окружающей среды (табачный дым, проникающая радиация, интоксикации) и внутренних факторов (гормональный дисбаланс, иммунодефициты, стресс, гипоксия). Общим свойством канцерогенов является способность вызывать мутации. С позиций теории канцерогенов рак понимается как генетически обусловленное заболевание ядра СК, спровоцированное воздействием внешних и внутренних канцерогенных влияний (Ермоленко, 2012).

Фундаментальная онкология выделяет несколько альтернативных теорий канцерогенеза. Мутационная теория предложена профессором Вирцбургского университета Теодором Бовери. Согласно этой теории злокачественная опухоль развивается вследствие накопления мутаций в специфических участках ДНК, которые приводят к образованию дефектных белков (Soto, Sonnenschein, 2014). Основная идея этой концепции заключена

в положении, что канцерогенез есть закономерное следствие мутаций одного или нескольких ключевых генов, что приводит к нарушению кариотипа, автономности, неуправляемости и иммортализации ОК. Достижением этой теории стало формирование стройной концепции онкогенов и генов-онкосупрессоров, которые формируют сложные механизмы контроля над процессами клеточного деления, роста и дифференцировки. Однако теория мутагенеза не давала ответов на большинство стратегически важных вопросов в лечении опухолей.

Логическим продолжением этой концепции стала «теория случайных мутаций». Ее автор – профессор Вашингтонского университета Лоуренс Леб (Lawrence Loeb) утверждал, что в любой клетке за весь период ее жизни мутация возникает в среднем в одном гене. Под действием канцерогенов и вследствие нарушения процессов репликации ДНК, частота мутаций резко возрастает, а неопластическая трансформация происходит только после того как клетка накопит некое предельно высокое число мутаций, которые обеспечат ей преимущество при делении, а потомству дадут стратегический приоритет в выживании (Loeb et al., 2003; Kennedy et al., 2012). Достижением этой теории является первичность процесса неопластической трансформации, а хромосомные перестройки следует рассматривать как побочный продукт канцерогенеза.

Последующая концепция – «теория ранней хромосомной нестабильности». Основоположники Кристоф Лингаур (Christoph Lengauer) и Берт Фогельштейн (Bert Vogelstein) полагали, что основной идеей является нестабильность генома, приводящая к гиперэкспрессии онкогенов и нестабильности экспрессии онкосупрессоров (Cahill et al., 1998). Нестабильность генома вместе с давлением естественного отбора легко трансформируется в доброкачественную опухоль, которая легко переходит определенный рубеж и приобретает злокачественные свойства (Cahill et al., 1998; Bardelli et al., 2001).

Альтернативная теория происхождения рака – теория анеуплоидии. Автор концепции – исследователь университета Беркли – Питер Дьюсберг (Peter Duesberg), полагал, что рак – это исключительно следствие анеуплоидии, а мутации в специфических генах не играют никакой роли в канцерогенезе (Duesberg et al., 2000). Анеуплоидия – патологическое состояние, при котором клетка содержит число хромосом, не кратное основному набору. В последнее время под анеуплоидией понимают также морфологические изменения хромосом (укорочение или удлинение, перемещение крупных участков). В естественных условиях подобная клетка должна быть сразу же уничтожена путем апоптоза. Однако у немногих выживших клеток доза генов оказывается отличной от других клеточных элементов ткани. Чем выше степень анеуплоидии, тем выше степень нестабильности генома, тем выше вероятность, что она сможет расти где угодно. Несомненным преимуществом этой теории является доказательство прямой связи между развитием злокачественных опухолей и анеуплоидией (Duesberg et al., 2006; Gordon et al., 2012).

Важным недостатком описанных концепций стало рассмотрение молекулярных механизмов канцерогенеза в отрыве от конкретного типа клеток. Необходимо отметить, что о первичном возникновении онкогенных мутаций, происходящих в клетках отличных от основного тканевого фенотипа, высказывались с начала 20-го века. Так Хьюго Рипперт (Hugo Rippert) высказывал мысль, что рак вызывается сохранившимися в тканях эмбриональными клетками, ускользнувшими от контроля над их размножением (Sell, 2008).

Достаточно близкой перечисленным концепциям стала «теория тканевого онкогенеза», утверждающая, что причина появления ОК заключается в нарушениях тканевого контроля над клоногенными клетками, обладающими активированными онкогенами. Основным аргументом в пользу данного утверждения служит способность опухолевых клеток приходить в норму при дифференцировке, что подтверждает возможность

взаимных переходов между нормальными и изменёнными клетками, вследствие воздействия внешних факторов (Soto, Sonnenschein, 2011).

Важным этапом современного понимания проблемы стала «теория четырех стадийного канцерогенеза», согласно которой движущей силой опухолевой трансформации являются повреждения генетического аппарата, превращающего протоонкогены в онкогены и резко повышающие их уровень экспрессии (Weston et al., 2003). Первичная трансформация начинается с трансформации генов, контролирующей пролиферацию и апоптоз, дальнейшей перестройке сигнальных путей, регулирующих эти влияния.

Воздействие ремоделирующих факторов позволяет активизировать измененные онкогены и инициировать пролиферативные каскады. Но опухолевый рост становится возможен, только если клетка сумеет ускользнуть от дальнейшей дифференцировки. Как правило, это связано с инактивирующим воздействием микроРНК, которые подавляют экспрессию генов онкосупрессоров, например, miR-34/ген c-Met, miR-146a/ген Notch, miR-7/ген EGFR, miR-128/ген Bmi1, miR-195/ген E2F3, ген CCND3 и стимулируют активность онкогенов miR-21/ген RECK, miR-26a/гены PTEN и RB1, miR-221 и 222/генов p27Kip1, PTP μ , PUMA (Брюховецкий и др., 2011; Брюховецкий и др., 2013).

Как правило, в итоге этих трансформаций формируется клон клеток, не свойственных нормальным клеткам организма. Эти клетки обладают высоким уровнем анеуплоидии, генетической нестабильностью и различными нарушениями митоза. В итоге клетки формируют стволовую линию.

В работах научной группы Питера Дьюсберга (Peter Duesberg) прослеживается четкий подход к пониманию канцерогенеза не только как сбоя системной регуляции над пролиферацией морфологических элементов ткани, но и как универсальный механизм эволюции эукариотических клеток (Duesberg et al., 2011). В этом ключе, формирование стволовой линии – особой группы клеток, имеющих высокую степень анеуплоидии и

хромосомной нестабильности, следует рассматривать как появление клеток принципиально нового типа, обладающего рядом специфических преимуществ. Однако согласно теории ОСК для формирования агрессивной, высоко инвазивной опухоли нужны недифференцированные СК (Yoo, Hatfield, 2008; Wu, Cao, 2012). На сегодняшний день эта концепция признана одной из самых перспективных в нейроонкологии. Нейральные стволовые и прогениторные клетки головного мозга человека рассматриваются большинством исследователей как наиболее вероятный источник происхождения злокачественных глиом (Sanai et al., 2005; Zong et al., 2012).

Первоначально, популяции постоянно пролиферирующих стволовых клеток были обнаружены в субэпендимной зоне боковых желудочков зрелого мозга мышей и крыс, а затем выделены из гиппокампа взрослых приматов и человека (Conover, Notti, 2008; Dengke et al., 2009). Герминативная зона зрелого мозга также содержит нейральные прогениторные клетки, являющиеся прямыми потомками нейральных стволовых клеток (НСК), обладающих высокой пролиферативной активностью и способностью к самостоятельной миграции (Doetsch, 2003; Decimo et al., 2012). Мультипотентность и способность к продолжительному самообновлению нейральных стволовых и прогениторных клеток обеспечивается генами семейства Sox, в частности Sox2, Ars2, циклин-зависимыми киназами (CDKN), контролируемые геном онкосупрессором p21 (Marqués-Torrejón et al., 2013; Thiel, 2013).

Глиальные опухоли – высоко гетерогенная группа новообразований, как на клеточном, так и на генетическом уровне. Однако гены, управляющие популяцией активно пролиферирующих опухолевых и нормальных стволовых клеток идентичны, также как и тождественны их белковые продукты. Регуляторы взрослого нейрогенеза Sox2 и Sox21 играют ключевую роль в пролиферации неопластических клеток, одновременно их инактивация останавливает рост глиомы *in vivo* (Ferletta et al., 2011; Kuzmichev et al., 2012). Один из важнейших онкосупрессоров – PTEN и его белковый продукт

– одноименная фосфатаза – активно вовлечены в процессы нейрогенеза во взрослом мозге (Gregorian et al., 2009). Мутантный белок p53 в ОСК глиом аналогичен таковому в нейральных стволовых и прогениторных клетках. Описана комплексная роль генов p53 и PTEN в процессах обновления и дифференцировки в нормальных нейральных и неопластических стволовых клетках (Koul, 2008; Wang et al., 2009; Yang et al., 2010; Yamadas et al., 2012).

В 2006 г. исследовательской группой Вескови (Vescovi) была идентифицирована группа активно пролиферирующих клеток мультиформной глиобластомы по экспрессии белка CD133 (Angelastro, Lamé, 2010). По способности порождать новые опухоли *in vivo* клетки CD133+ значительно превосходят другие, они активно пролиферируют *in vitro*, где формируют нейросферы (глиомасферы), а при добавлении в культуральную среду различных ростовых факторов (VEGF, NGF, BMP) способны дифференцироваться в морфологические элементы других типов (Bi, et al., 2007; Ravon et al., 2013). Нестин – основной белок клеточной поверхности стволовых клеток глиобластомы и служит важным идентификатором всех типов взрослых стволовых клеток. CD15 вместе с белком CD133 (*promin1*) активно выделяется клеточной поверхностью НСК (Veselska et al., 2006; Palmer et al., 2011; Jin et al., 2013). CD34 – маркер стволовых клеток красного костного мозга, также идентифицирован в митотически активных клетках большинства видов глиом (Galloway, 2010).

Кариотип НСК весьма не стабилен и при длительном культивировании они накапливают хромосомные аномалии, тиражируемые в серии всех последующих пассажей. Описаны случаи трисомии по 7, 12, 17, 19 и X хромосомам, различные формы анеуплоидии и повышенный уровень экспрессии теломеразы (Peterson et al., 2008; Sareen et al., 2009). Спонтанная неопластическая трансформация НСК возможна после серии пассажей *in vitro*, что не характерно для гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток (Torsvik, et al., 2012). И НСК и ОСК используют для пролиферации

одни и те же сигнальные пути: Notch, hedgehog – Gli, RTK-Akt, BMPs/TGF β , Wnt-Frizzled, STAT3 (Altaner, 2008; Qiao et al., 2013).

Однако при всей общности генетических и эпигенетических механизмов в нормальных и ОСК, главной особенностью последних остается способность восстанавливать поврежденную ДНК, что составляет основу резистентности к современным лекарственным и радиотерапевтическим методам (Kolenda et al., 2011; Shi et al., 2012; Yang et al., 2012; Zhou et al., 2013).

1.4. Опухолевые стволовые клетки (ОСК)

Впервые ОСК удалось обнаружить около 50 лет назад при миелоидной лейкемии, новообразованиях молочной железы и первичных опухолях головного мозга (Heryanto et al., 2015; Sullivan et al., 2010). В организме стволовые клетки находятся в нишах, представляющих собой анатомическую субъединицу тканевого компартмента (Morrison, Spradling, 2008). Различные клеточные ростки имеют разные ниши в костном мозге. В лечении гемобластозов и других форм рака важнейшим этапом является облучение и высокодозная химиотерапия. Уничтожая собственные гемолимфопоэтические стволовые клетки, эти факторы разрушают их локальное микроокружение в костном мозге. Стволовые клетки, трансплантируемые в последующем больному, сами находят область повреждения, заселяют и ремоделируют ее (Copelan, 2006).

В 2008 г. учеными было показано, что глиомы состоят из активно пролиферирующих анеуплоидных клеток, окруженных нормальными фибробластами, нейробластами, клетками эндотелиальной и миелоидной линий. Эти клетки способствуют ангиогенезу и локальному моделированию в неопластической ткани лимфатической и нервной сетей (Garmy-Susini, Varner, 2008). Способность НСК к продукции NGF, артемина, нетрина и BDNF, FGF и VEGF является основным условием ремоделирования кровеносной сети в условиях острой ишемии или после травматического

повреждения мозга. Иными словами, мутантная стволовая клетка рекрутирует другие клетки организма и использует их потенциал в собственных целях (Garzón-Muvdi, Quiñones-Hinojosa, 2009; Behnan et al., 2014).

Считается, что общее количество ОСК в солидных опухолях составляет 1-2% от общего числа клеток. Но данные клонального и популяционного анализа глиальных опухолей IV степени злокачественности, удаленных из головного мозга человека, свидетельствуют, что 40-96% клеток являются стволовыми, что проявляется способностью легко вызывать и до бесконечности поддерживать однотипную опухоль (Tabatabai, Weller, 2011; Janiszewska et al., 2012; Jiang et al., 2012; Golebiewska et al., 2013). Очевидно, это и является основной причиной низкой эффективности существующих видов лечения мультиформной глиобластомы.

ОСК – не однородная популяция. Среди CD133+ ОСК глиобластомы человека содержится много CD31+-клеток сосудистого эндотелия, которые формируют периваскулярные ниши и создают барьер, препятствующий проникновению в опухоль химиопрепаратов. Особая «боковая» популяция CD133+ клеток способна к продукции специфических белков – транспортеров (АТР-cassette transporters), активно выводящих химиотерапевтические вещества из клетки и противодействующих их попаданию обратно (Declèves et al., 2006; Hlaváč et al., 2013). В эксперименте *in vitro* CD133+-клетки «боковой популяции», выделяя транспортеры ABCG2 и ABCA3, практически не чувствительны к химиотерапевтическим веществам. Способность восстанавливать поврежденную ДНК достигается продукцией CD133+-клетками особого фермента Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы, более известной как MGMT фактор. Этот механизм в сочетании с активацией ATM, Rad17, Chk2, Chk1 белков позволяет клетке с поврежденным геномом пройти контрольные точки клеточного цикла (Oberstadt et al., 2013).

Таким образом, стволовая клетка взрослого организма, будучи инструментом тканевого гомеостаза и оздоровления, одновременно является главной мишенью для различных канцерогенных факторов и основным объектом процессов мутагенеза (Dittmar et al., 2012; Donghong et al., 2012; Faltas, 2013). По мере накопления генетических нарушений такая клетка приобретает способность преодолевать критически значимые, контрольные точки клеточного цикла и начинает активно пролиферировать, сохраняя при этом свой иммуноцитохимический профиль и возможность порождать клетки различных типов, приобретая потенции рекрутировать и перепрограммировать нормальные стволовые и соматические клетки. Продолжительное существование такой клетки в позволяет ей накопить необходимый количественный потенциал, что ведет к глубокому качественному нарушению внутритканевой иерархии. По мере своего существования ОСК продолжают эволюционировать и приобретают способности противостоять всем существующим методам терапии (Chamberlain, 2010; Thomas et al., 2014). На сегодняшний день, главным препятствием в лечении глиом является инвазивный характер роста и особые свойства ОСК.

1.5. Миграция стволовых клеток

Впервые феномен направленной миграции НСК был открыт группой ученых совместно с Карен Эбоди (Aboody et al., 2000). Данный феномен проливает свет на процесс трансформации здоровой стволовой клетки в ОСК. При достижении генетически детерминированного пролиферативного лимита и/или накопления предельного числа мутаций стволовая клетка приобретает ряд принципиально новых свойств. Нейрогенез в мозге замедляется с возрастом, соответственно уменьшается количество здоровых НСК, их регуляторные свойства становятся слабее (Mimeault, Batra, 2009; Liu, Rando, 2011; Stoll et al., 2013; Franco et al., 2015). В таких условиях, НСК, накопившие предельное число мутаций, но сохранившие способности к

миграции, пролиферации и взаимодействию с внеклеточным матриксом, могут запустить комплексную программу инвазивного роста. Позднее учеными было показано наличие феномена направленной миграции на других типах СК – ММСК, НСК (Kim et al., 2010; Donghong et al., 2012; Gao et al., 2012; Vogel et al., 2013).

Феномен направленной миграции СК в область травмы, ишемии или неопластического поражения стал критически важным шагом в понимании процессов регенерации тканей ЦНС и очередной ступенью к пониманию молекулярной биологии процессов канцерогенеза (Aboody et al., 2000; Kim et al., 2010; Zhao et al., 2012). На протяжении ряда лет специализированные онкологические учреждения в России и за рубежом успешно используют СК периферической крови, основу которого составляют сепарированные мононуклеарные клетки с высоким содержанием ГСК (Copelan, 2006; Barrig et al., 2012; Felfly, Haddad, 2014).

Рост опухоли сопровождается гипоксическим повреждением клеток ЦНС, что приводит к гиперэкспрессии генов семейства HIF и запускает продукцию SDF-1 α , HMGB1, SCF, VEGF и других цитокинов привлекающих СК (Siegel et al., 2010; Yang et al., 2012; Hsieh et al., 2015). Взаимодействие лигандов с соответствующими рецепторами клеточной поверхности СК индуцирует приобретение клетками локомоторного фенотипа, выход из ниш и миграцию в область повреждения (Kim et al., 2010; Koizumi et al., 2011; Sahin, Buitenhuis, 2012).

Количество СК является одним из не менее важных параметров тканевого гомеостаза (Kennedy et al., 2012; Franco et al., 2015). Непрерывное образование, миграция, межклеточное взаимодействие и гибель нейробластов в мозге представляет собой одну из комплексных саногенетических программ. Интенсивность нейрогенеза в мозге ослабевает по мере старения индивида, уменьшается количество здоровых нейральных СК, они накапливают мутации, снижается их регуляторный потенциал, что,

отчасти, объясняет преобладание глиом у пожилых пациентов (Vouab et al., 2011; Kennedy et al., 2012).

Стратегической функцией мигрирующих стволовых клеток в патологический очаг является возвращение клеток в состояние устойчивого равновесия. (Dittmar et al., 2012). Обнаружены множество молекул, привлекающих стволовые клетки в патологический очаг. Хемокин семейства CXС – фактор стромальных клеток (SDF-1 α) – белковый продукт гена CXCL12, является главным регулятором трафика всех типов стволовых клеток в организме человека (Vagima et al., 2011). В эмбриональный период взаимодействие SDF-1 α с рецептом CXCR4 управляет миграцией гемопоэтических стволовых клеток из эмбриональной печени в костный мозг и организует органогенез, а в постнатальном периоде выступает главным модератором процессов регенерации. SDF-1 α активно продуцируется в ответ на повреждение миокарда, скелетных мышц, печени, сетчатки глаз. При повреждении головного мозга основным источником SDF-1 α являются активированные астроциты, клетки микроглии и эндотелия кровеносных сосудов (Tang et al., 2011). Биологическим смыслом этого процесса является активное привлечение стволовых клеток в область повреждения. Экспрессия рецепторного белка CXCR4 в СК контролируется фактором, индуцированным гипоксией (HIF-1), трансформирующим ростовым фактором (TGF- β 1), ядерным фактором NF- κ B, фактором роста эндотелия кровеносных сосудов (VEGF), α -интерфероном (IFN- α), интерлейкинами, кортикостероидами и рядом других молекул (Mimeault, Vatra, 2013). ОСК также имеют на своей поверхности рецептор CXCR4 (Trautmann, 2014). В ответ на рост градиента SDF-1 α они способны выходить из своих ниш, инфильтрировать окружающую ткань, мигрировать на значительные расстояния, проникать в кровеносное русло и метастазировать.

Фактор роста стволовых клеток (SCF) взаимодействует с рецептором С-kit (CD117) поверхности гемопоэтических стволовых клеток. Более 90% НСК клеток человека несут на своей поверхности рецептор к этому лиганду.

Взаимодействие пары SCF/c-kit активирует многочисленные сигнальные каскады, включая RAS/ERK, PI3-K, JAK/STAT и Src-киназы, результатом чего становится миграция, выживание и пролиферация стволовых клеток, как в области ишемического повреждения, так и в зоне неоплазии (Summerfield et al., 2003; Smith et al., 2005).

Фактор роста эндотелия кровеносных сосудов (VEGF) является одним из важнейших цитокинов, который обеспечивает перемещение пула пролиферирующих НСК на длительные дистанции, а в зрелом мозге обеспечивает их миграцию по ростральному миграционному тракту. VEGF является одним из самых мощных индукторов ангиогенеза и клеточной миграции (Fiedler et al., 2005; Li et al., 2005). Продукция VEGF опухолевыми клетками резко повышается в ответ на гипоксию, что наиболее характерно для злокачественных глиом (Kaur et al., 2005).

Феномен целенаправленной миграции СК в опухолевый очаг, описанный научной группой Карен Эбоди (Aboody et al., 2000), пролил свет на ряд очень важных аспектов этой проблемы. Рост опухоли в мозге или в любом другом органе приводит к повреждению тканей и запуску экспрессии генов семейства HIF (hypoxia-inducible factor), которые регулируют продукцию цитокинов, привлекающих СК (Silva-Vargas et al., 2013). Гипоксия – наиболее критический параметр микроокружения глиом и в максимально гипоксических областях опухоли приводит к продукции высоко активных молекул семейства факторов HIF-1 α и HIF-2 α . Известно более ста генов-мишеней для HIF, среди которых гены выживаемости, миграции, инвазии, пролиферации, ангиогенеза и дифференцировки (Kaur et al., 2005; Seidel et al., 2010; Kolenda et al., 2011). Наряду с гипоксией, стресс – не менее важный фактор. Клетки глиомы и ряда других опухолей мозга активно накапливают большое количество глутамата (Sontheimer, 2008). Резкое высвобождение этого нейротрансмиттера вызывает оксидантный стресс и активирует процессы эксайтотоксичности, что вызывает перифокальную ишемию ткани мозга, окружающую опухоль. В свою очередь,

индуцированное HIF-1 α высвобождение цитокинов порождает процессы направленной миграции стволовых клеток в неопластический очаг.

Согласно данным литературы (Брюховецкий и др., 2013), основным источником цитокинов, привлекающих СК в опухоль, являются дегенерирующие ткани клеточного микроокружения опухоли, соответственно сам феномен миграции СК в область неопластического повреждения длительное время исследователями рассматривался только как саногенетический процесс (Silva-Vargas et al., 2013). Однако не решенным остается важнейший вопрос фундаментальной биологии опухолей, может ли сама опухолевая ткань привлекать СК без участия окружающих тканей и какие клеточные и молекулярные механизмы канцерогенеза лежат в основе данного межклеточного взаимодействия.

1.6. Существующие подходы к применению стволовых клеток в онкологии

С момента открытия СК Максимовым А.А. прошло более ста лет (Мяделец и др., 2007). Применение СК в комплексном лечении злокачественных опухолей в 60-х г. 20-го века стало революционным научным событием. Сегодня СК – магистральный тренд в развитии биотехнологий и новая клиническая реальность мировой медицины (Nadig, 2009; Lunn et al., 2011; Larijani et al., 2012). СК применяются для реконструкции кроветворной системы после химиотерапии, коррекции иммунодефицитных состояний, создания новых противоопухолевых вакцин, цитотоксических лимфоцитов и дендритных клеток (Simonsson et al., 2005; Barrett, Blanc, 2010; Huang et al., 2011; Gir et al., 2012; Nishimura, Takahashi, 2013). Перспективным направлением использования СК является направленный транспорт лекарственных веществ непосредственно в опухолевый очаг и создание генетически модифицированных клеток (Pellegatta, Finocchiaro, 2009; Auffinger et al., 2013). Но, чем шире становится

спектр клинического применения СК, тем острее встает вопрос об их истинной роли в развитии злокачественных новообразований.

С одной стороны, роль СК в развитии рака и других злокачественных опухолей можно считать доказанной. Накоплены и систематизированы весомые аргументы в пользу развития глиом от собственных НСК и прогениторных клеток мозга человека (Bjerkvig et al., 2005; Sanai et al., 2005; Vu, Cao, 2012; Zong et al., 2012). Сформулирована концепция ОСК, обоснована роль СК в процессах инвазивного роста и метастазирования злокачественных опухолей (Aboody et al., 2000; Altaner, 2008; Behnan et al., 2014). Не менее показателен тот факт, что большинство линий опухолевых клеток для экспериментальной онкологии получены путем индукции канцерогенеза именно у беременных животных (Barth, Kaur, 2009).

С другой стороны, противоопухолевые свойства СК неоднократно доказаны. Механизмами их противоопухолевого действия является направленная миграция в зону неоплазии (Simonsson et al., 2005; Kosztowski et al., 2009; Hua et al., 2013), регуляторные межклеточные и межсистемные взаимодействия с ОК, запущенные путем активизации соответствующих рецепторов, обмена цитокинами и другими биоинформационными молекулами.

Особого внимания заслуживает эффект «рядом стоящего», более известный как «bystander effect» (Li et al., 2012) и феномен клеточного слияния (Lu, Kang, 2011; Dittmar et al., 2012; Lazova et al., 2013).

Решение проблемы эффективной и безопасной терапии опухолей человека с применением аутологических СК требует исключительно ответственного выбора клеточных линий и точное определение вектора их перепрограммирования и модификации, который задаст направленность взаимодействия с ОК.

СК обладают двумя ключевыми свойствами – способностью самообновляться и мультипотентностью (Gonzalez, Bernad, 2012). Первое предполагает, что после деления остается, как минимум, одна клетка

полностью идентичная материнской, которая сохраняет ключевые свойства СК. При симметричном делении таких клеток образуется две, в отличие от асимметричного деления, когда одна клетка сохраняет свойства СК, а вторая получает программу развития. Под мультипотентностью СК понимают способность порождать клетки различных видов. По принципу потентности СК дифференцируют на три группы – тотипотентные, плюрипотентные и унипотентные (Fortier, 2005).

Тотипотентные СК способны дифференцироваться в клетки всех типов и дают начало полноценному организму. Основным источником этих СК – оплодотворённая яйцеклетка или зигота. СК, образованные при первых циклах деления зиготы, также являются тотипотентными и обладают теломеразной активностью.

Плюрипотентные СК – это прямые потомки тотипотентных СК, они способны дифференцироваться практически во все типы клеток организма млекопитающих и человека и дают начало эктодерме, мезодерме и энтодерме. СК этих образований также способны дифференцироваться в клетки различных типов, но только в пределах своего зародышевого листка.

Унипотентные СК обладают минимальным дифференцировочным потенциалом и способны к многократному самовоспроизведению, что делает их долговременным источником клеток одного конкретного типа. В практической медицине, в соответствии с источником получения, СК принято классифицировать на эмбриональные, фетальные и постнатальные, или СК взрослого организма. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) – плюрипотентные СК, которые образуют внутреннюю клеточную массу на ранней стадии развития эмбриона. ЭСК обладают огромным дифференцировочным потенциалом, *in vitro* они способны преобразоваться в клетки, имеющие специфические маркеры нейронов, глиоцитов, эндотелия, кератиноцитов, трофобластов, кардиомиоцитов, остеобластов, клеток крови, гепатоцитов, инсулин-продуцирующих клеток и некоторых других (Wobus, Boheler, 2005). Помимо дифференцировочного потенциала, важнейшей

особенностью ЭСК является отсутствие экспрессии антигенов HLA, что позволяет избежать отторжения в организме. Однако ряд ведущих ученых высказывает мнение, что ЭСК не способны осуществить реставрацию и регенерацию поврежденной ткани, так как уже перепрограммированы в оплодотворенной яйцеклетке исключительно на органогенез и эмбриогенез (Gepstein, 2002; Shufaro, Reubinoff, 2004). Применение ЭСК открывает большие перспективы. Исключительно высокий дифференцировочный потенциал ЭСК с прогрессом в развитии технологий тканевой инженерии и 3D биопринтинга позволит создавать искусственные органы и их компоненты, трансплантируемые взамен поврежденных опухолевым процессом (Chopra, Chopra, 2013; Tasoglu, Demirci, 2014).

В 2006 г. Шинья Яманака (Shinya Yamanaka) сообщил о создании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS), репрограммируя соматические клетки, путем введения в них генов Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc и Nanog, кодирующих транскрипционные факторы ЭСК (Kim, 2010). Однако недостатком этой технологии является малое количество iPS-клеток, а также огромный риск развития опухолей и генетических заболеваний. Совершенствование технологий получения iPS-клеток снимает многие этические проблемы, связанные с получением ЭСК.

Источником получения фетальных СК является плодный материал, получаемый при аборте на сроке гестации 9-12 недель (Kent, 2008). Помимо этических сложностей, использование этого материала сопряжено с опасностью инфицирования пациента. На сегодняшний день, эмбриональные и фетальные СК, обладая исключительно высокой вариативностью дифференцировки, ограниченно применимы для лечения злокачественных опухолей (Ishii, 2014).

Постнатальные СК – основной материал современной онкологии и регенеративной медицины. Взрослые мультипотентные постнатальные клетки уже получили свой вектор дифференцировки. Возможности их получения непосредственно от пациента позволяет избежать разногласий по

этическим и правовым вопросам, а использование аутогенного материала позволяет избежать проблем иммунного отторжения трансплантата. Стволовые клетки взрослого организма можно подразделить на три основных группы: гемопоэтические, мультипотентные мезенхимальные стромальные и тканеспецифичные прогениторные клетки (Gonzalez, Bernad, 2012).

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – мультипотентные клетки, дающие начало всем клеткам крови. Костный мозг человека содержит три субпопуляции этого типа клеток (лимфоидно-ориентированную, миелоидно-ориентированную и сбалансированную). ГСК получают непосредственно из периферической крови. Вторым по значимости источником является пуповинная кровь, которая собирается на самом раннем этапе жизни организма, когда клетки наиболее активны и не подвергались негативному воздействию внешней среды (Ng et al., 2009).

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) – СК, ортодоксальными путями дифференцировки для которых является трансформация в остеобласты, хондроциты и адипоциты. Основным источником ММСК является ККМ (Penforinis, Pochampally, 2011). Естественная тканевая ниша ММСК расположена периваскулярно. ММСК обнаружены в жировой ткани, пульпе молочных зубов, амниотической жидкости, пуповинной крови.

Тканеспецифичные прогениторные клетки (клетки-предшественницы) – малодифференцированные клетки, которые располагаются в различных тканях и органах и отвечают за обновление их клеточной популяции. Эти клетки являются олиго- и унипотентными и их главное отличие от других стволовых клеток в том, что клетки-предшественницы могут делиться лишь определённое количество раз, в то время как другие стволовые клетки способны к неограниченному самообновлению (Weissman et al., 2001; Young et al., 2004).

Способность СК мигрировать в область неоплазии, преодолевая при этом значительные расстояния от места введения, стала основой для

разработки ряда принципиально новых технологий адресной доставки терапевтических агентов непосредственно в опухолевую ткань (Porada, Almeida-Porada, 2010; Tran, Damaser, 2015). Адресная доставка фармакологических препаратов СК непосредственно к месту действия позволила преодолеть проблему непроницаемости гематоэнцефалического барьера, снизить токсичность химиотерапии, воздействовать на гипоксические зоны опухоли (Porada, Almeida-Porada, 2010; Greco, Rameshwar, 2012). Помимо транспорта химиотерапевтических веществ особо перспективными представляются инновационные методы высокоточной доставки в опухолевые клетки терапевтических генов, искусственных хромосом, антител, ферментов и специализированных наноконструкций, резко изменяющих течение биохимических процессов в неопластических клетках (Frank et al., 2010; Kazuki, Oshimura, 2011).

Одна из первых попыток применения СК для доставки терапевтических генов в опухоль была предпринята в 2000 г. Группе Карен Эбоди (Aboody et al., 2000) удалось редуцировать более 50% опухолевой массы с одновременным воздействием, как на основной опухолевый узел, так и на его сателлиты. Преимущества клеточных биотехнологий перед вирусными носителями заключаются в большей емкости для терапевтического гена и отсутствии опасности мутагенеза, вызванного интеграцией вируса в геном хозяина. Сегодня отработаны приемы адресной доставки в опухолевые клетки генов p53, IL12, TRAIL, IFN- β (Dwyer et al., 2010; Kwiatkowska et al., 2013). Совершенствование генно-терапевтических конструкций и создание искусственных хромосом открыло принципиально новые перспективы для использования не только транспортного, но и репаративного потенциала СК при лечении глиальных опухолей.

Стволовые клетки, направленно мигрирующие в ткань опухоли, могут стать принципиально новой платформой для терапии антителами, позволяющей преодолеть проблемы токсичности и избирательно воздействовать на гипоксические зоны опухоли, недостижимые для

фармацевтических субстанций, вводимых в системный кровоток. Лимитирующими факторами СК является их потенциальная иммуногенность и сложность выбора оптимальных клеточных линий, как и источников их получения (Majidi et al., 2009; Scott et al., 2012).

Иммуногенность стволовых клеток – вопрос дискуссионный (Schu et al., 2012; Charron, 2013; De Almeida et al., 2013; Tan et al., 2014). Нейральные и мезенхимные стволовые клетки обладают некоторой степенью «иммунных привилегий». В стабильном, не воспалительном состоянии, эти линии не экспрессируют антигенов II класса главного комплекса гистосовместимости и продуцируют только низкий уровень белков I класса (MHC I) и различные костимуляционные молекулы CD80, CD86. Низкий уровень продукции стволовыми клетками противовоспалительных цитокинов гарантирует их выживание в условиях трансплантации и защищает от фатального воздействия НК-клеток. Возможными путями преодоления проблемы иммунного отторжения является использование аутологического материала, фармакологическая иммуносупрессия, подбор клеточных линий, обладающих наилучшей туморотропностью при оптимальной продолжительности их пребывания в опухолевом сайте.

Развитие нанотехнологий открыло перспективы адресной доставки в неопластические клетки нанокапсул, содержащих противоопухолевые молекулы (Hughes, King, 2012; Laine et al., 2012; Figueiró et al., 2013). Высокая эффективность при отсутствии побочных эффектов системной химиотерапии являются стратегическими преимуществами этой технологии. Отрабатывается идея доставки СК к опухоли радиоактивных изотопов, накопление которых нарушает привычное течение метаболических процессов (Zhang et al., 2010). Перспективным материалом для транспорта в неопластический очаг являются нанокапсулы золота (Schnarr et al., 2013). Инкорпорируя их в СК, можно создать в опухоли максимальную концентрацию металла с целью последующей фототермальной абляции.

Отправной точкой идеи циторегуляторной терапии является тезис о том, что главной задачей стволовой клетки, мигрирующей в область повреждения мозга или любого другого органа, является именно биоинформационная оценка обстановки и индукция соответствующих эффекторных функций – пролиферации, дифференцировки, апоптоза (Cheung, Rando, 2013; Burgess et al., 2014). Фундаментальную базу метода составляет феномен направленной миграции стволовых клеток в зону неоплазии, эффект молекулярной адгезии, эффект «рядом стоящего». Конечной целью биоинформационного воздействия репрограммированных стволовых клеток является запуск апоптоза в неопластических клетках (Hua et al., 2013). Модификация регуляторного сигнала трансплантируемых клеточных систем в заданном направлении, может быть достигнута предобработкой химическими индукторами, облучением, генетической модификацией (Zhang et al., 2010; Hughes, King, 2012; Laine et al., 2012; Figueiró et al., 2013; Schnarr et al., 2013). Стволовые клетки, индуцированные в направлении апоптоза безопасны при трансплантации, поскольку риск формирования новых опухолей минимален.

Если рассматривать гипотезу развития глиальных опухолей от предельного числа мутаций в НСК, то одним из самых первых признаков превращения НСК в ОСК будет трансформация клеточного протеома, что вызвано накоплением дефектных белков и ведет к нарушению эпигенетической регуляции экспрессии генов и подавлению онкосупрессоров (Sanai et al., 2005; Zong et al., 2012). В этой связи, сама идея применения аутологических НСК, выделенных из верхней носовой раковины или полученных биоинженерным путем, не представляется актуальной. Однако применение других по происхождению аутологических СК уже сегодня представляется очень перспективным. Сравнение протеомных профилей свидетельствует о наибольшей глубине отличий мезенхимальных (CD29+ CD44+ CD73+ CD90+ CD34-) СК костного мозга человека от НСК (CD133+), выделенных из обонятельной выстилки носа человека и опухолевых СК

(CD133+) глиобластомы человека линии U87 (Bryukhovetskiy et al., 2014). Указанное обстоятельство позволяет предположить, что СК костного мозга в значительной степени сохранили свой естественный циторегуляторный потенциал и уже сегодня могут быть использованы для оптимизации существующих схем противоопухолевой терапии.

Методы, разработанные для уничтожения активно делящихся клеток, не эффективны в отношении не делящихся (интерфазных) клеток, инфильтрирующих мозговую ткань, которые в конечном итоге могут образовывать новые опухоли (Vinogradov, Wei, 2012). Это диктует необходимость использования моделей для системного изучения механизмов инвазии, клеточной миграции и их влияния на функции мозга. Инвазивность ОК стратегически важное требование для целей работы. В свою очередь, имплантация ОК в ткань головного мозга животных имитирует классические механизмы опухолевого роста, что имеет преимущество перед упрощенными моделями, поскольку включает воспалительные и сосудистые реакции (Çağatay et al., 2005; Barth, Kaur, 2009). Именно с этих позиций мы отказались от использования иммунодефицитных крыс в пользу лабораторных животных породы Вистар.

Направленный транспорт – это только одна из возможностей использования СК для лечения глиом. *In vivo* НСК и другие регуляторные клетки, достигая зоны неоплазии, вступают в активные межклеточные и межсистемные отношения с ОК (Aboody et al., 2000; Bao et al., 2008; De Almeida et al., 2012). Итогом этого процесса будет либо индукция в ОК апоптоза и других саногенетических программ, либо вовлечение в неопластический процесс. Поэтому изучение взаимодействия стволовых клеток с микроокружением и последующий правильный выбор вектора модификации СК являются стратегически важными задачами при создании новых антиметастатических и противораковых клеточных препаратов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клеточные культуры

Клеточная линия глиомы С6. Экспериментальная биология располагает рядом клеточных линий, используемых для моделирования злокачественных опухолей головного мозга: CNS 1, RT-2, BT4C, F 98, RG 2, T9 и С6 (Bryant et al., 2008; Barth, Kaur, 2009).

Линия CNS-1 получена путем инъекций N-метил-N-нитрозомочевины инбредным крысам Льюиса. Модель подходит для изучения специфики взаимоотношений с внеклеточным матриксом, макрофагами и Т-клетками (Barth, Kaur, 2009).

Линия RT-2 получена путем введения птичьего вируса саркомы новорожденным крысам Фишера. Клетки RT2 продуцируют эпидермальный фактор роста (EGF). При имплантации в головной мозг формируют астроцитомы либо саркомы. Модель подходит для изучения воздействия химиотерапии, облучения и процессов противоопухолевого иммунного ответа (Barth, Kaur, 2009).

Линия BT4C получена путем введения N-этил-N-нитрозомочевины беременным крысам. Клеточная линия BT4C больше подходит для изучения изменений, вызванных облучением и применением химиопрепаратов – антагонистов ангиогенеза (Barth, Kaur, 2009).

Линия F98 получена в университете штата Огайо. Модель наиболее часто используется для оценки эффективности различных терапевтических агентов и изучения бор-нейтрон-захватной терапии (Barth, Kaur, 2009).

Клеточная линия глиомы RG2 создана в Университете штата Огайо, путем химически индуцированного канцерогенеза у беременных крыс Фишера. Модель подходит для изучения транспорта лекарственных веществ через ГЭБ, отработки режимов химиотерапии и облучения (Barth, Kaur, 2009).

Линия T9 получена в лаборатории Массачусетского генерального госпиталя. Клеточная рекомендована для проведения исследований по оценке эффективности антиангиогенной терапии (Barth, Kaur, 2009).

Линия 9L была получена путем введения N-этил-N-нитрозомочевины крысам Фишера. Модель используется для изучения механизмов лекарственной устойчивости, транспортировки химиопрепаратов через ГЭБ, разработки новых методов визуализации (Barth, Kaur, 2009).

Линия C6 выведена в лаборатории Массачусетского генерального госпиталя путем инъекций N-метил-нитрозомочевины крысам породы Вистар и включена в американскую коллекцию клеточных культур (ATCC № CCL-107). Клетки глиомы C6 отличаются разнообразием формы и количества ядер, избыточно экспрессируют PDGF и EGFR. При имплантации в мозг они быстро формируют опухоль, которая характеризуется инфильтрацией и инвазией паренхимы головного мозга неопластическими клетками (Barth, Kaur, 2009).

Модель глиомы C6 применима для оценки терапевтической эффективности различных методов химиотерапии, антиангиогенной, лучевой, фотодинамической, вирусной и генной терапии. Используется для изучения процессов инвазии, миграции, нарушения ГЭБ, ангиогенеза. Глиома C6 имеет самое большое количество ОСК из всех видов экспериментальных глиом, способна интенсивно расти *in vitro* и формировать новые опухоли *in vivo* (Çağatay et al., 2005; Barth, Kaur, 2009). Исходя из этих параметров, клеточная линия глиомы C6 выбрана как наиболее подходящая для целей и задач исследования. Данная клеточная линия была предоставлена НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Культивирование клеток глиомы линии C6. Криопробирку с аликвотой клеток извлекали из жидкого азота, размораживали в течение 5 мин, при 37°C, переносили содержимое в 15 мл фалькон, добавляли свежей среды (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco; In=11971025)), далее – DMEM,

центрифугировали при 120g 3 мин. Сливали супернатант, добавляли среды DMEM + 10% фетальную бычью сыворотку, далее (FBS; In16000036) и антибиотик-антимикотик 100X (15240-062), содержащий 10,000 уд. ед/мл пенициллина, 10,000 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл фунгизона, (все реагенты компании Gibco). Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием 0,4% раствором трипанового синего (Gibco; 15250-061). Подсчет клеток производили в камере Горяева. Клетки высевали на 25 см² культуральные флаконы по 10³ клеток на 1 см². Каждые 3-4 сут заменяли культуральную среду на свежую.

При достижении 95% конfluence, для диссоциации клетки обрабатывали раствором TrypLE Express Enzyme далее – TrypLe (Gibco; 12604-021) в течение 7 мин, при 37°C, клетки перемещали в 15 мл фалькон, центрифугировали при 120g 3 мин, сливали супернатант, добавляли свежей среды DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик и высаживали в новые 25 см² культуральные флаконы.

Перед экспериментом культуру клеток С6 снимали при помощи TrypLE 7 мин, при 37C, центрифугировали при 120g 3 мин, сливали супернатант, добавляли свежей среды DMEM, подсчет клеток производили в камере Горяева, жизнеспособность определяли путем окрашивания 0,4% трипановым синим (Gibco; 15250-061). Перед внесением в смешанную культуру или трансплантацией в мозг животных, клетки предобрабатывались флуоресцентными красителями CellTracker Red CMTPX Dye далее – RED CMTPX (Molecular Probes; C34552) либо Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit далее – CFDA SE (Molecular Probes; V12883) в соответствии с рекомендациями производителя.

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Культура ГСК человека была предоставлена клиникой восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «Нейровита» (г. Москва). Согласно оригинальной сопроводительной документации, с целью увеличения количества стволовых клеток в периферической крови донор получал 8 инъекций гранулоцитарного

колониестимулирующего фактора с интервалом 12 ч в течение 4 сут. В первые 3 сут доза гранулоцитарного колониестимулирующего фактора составляла 2,5 мкг/кг массы тела, а в последний день была удвоена.

ГСК извлекали из периферической крови с помощью аппарата COBE Spectra Apheresis System. Сортировку клеток фенотипа CD34+ осуществлялась методом иммуномагнитной сепарации на разделительной колонке AutoMACS Pro с использованием набора реагентов (Miltenyi Biotec; 130-100-453). Использование материала в экспериментальных целях проводилось с согласия пациента.

Для проведения эксперимента пробирку с аликвотой клеток размораживали при 37°C в дистиллированной воде в течение 5 мин, переносили содержимое в 15 мл фалькон, добавляли свежей среды DMEM + 10% FBS и 100X антибиотик-антимикотик. Клетки оценивали на жизнеспособность окрашиванием 0,4% трипановым синим (Gibco; 15250-061) и производили подсчет клеток в камере Горяева. Высеивали клетки на 75 см² культуральные флаконы из расчета 2x10⁴ клеток на 1 см³. Культивирование продолжали в течение 2 сут. Перед экспериментом культуру ГСК сливали в 15 мл фалькон, центрифугировали при 120g 3 мин, супернатант сливали, добавляли свежей среды DMEM + 10% FBS и 100X антибиотик-антимикотик, клетки оценивали на жизнеспособность в камере Горяева путем окрашивания 0,4 % трипановым синим (Gibco; 15250-061). Производили подсчет клеток в камере Горяева.

Перед внесением в смешанную культуру клетки были обработаны флуоресцентным клеточным трейсером RED CMTPX (Molecular Probes; C34552) либо флуоресцентным клеточным трейсером CFDA SE (Molecular Probes; V12883) в соответствии с рекомендациями производителя.

Фибробласты крысы. Клетки были предоставлены Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина РАМН. Для получения культуры клеток использовали крысиные 12-дневные эмбрионы. Самку крысы Вистар глубоко наркотизировали эфиром, тело протирали 70%

спиртом. В стерильных условиях вскрывали брюшную полость, из рогов матки, вынимали эмбрионы и помещали их в стерильный раствор Хенкса (Gibco; 14025-092) с добавлением 100X антибиотика-антимикотика. У эмбриона удаляли конечности, голову и внутренние органы. Оставшуюся массу измельчали ножницами на маленькие кусочки и подвергали ферментной диссоциации TrypLE Express Enzyme далее – TrypLe (Gibco; 12604-021) в течение 15 мин, при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием (120 g, 5 мин). Осадок ресуспендировали в полной среде DMEM/F12, HEPES (Gibco; 31330-095) + 10% FBS, 2 mM L-глутамин (Gibco; 25030-081), 0,8% глюкозы (Gibco; A2494001) и 100X антибиотика-антимикотика. После культивирования клетки подвергались хранению при глубокой заморозке в жидком азоте.

Для проведения эксперимента криопробирку с клетками извлекали из условий жидкого азота, оттаивали в 37°C дистиллированной воде в течение 5 мин, переносили содержимое криопробирки в 15 мл фалькон. Добавляли свежей среды DMEM + 10% FBS, 10 нг/мл EGF – эпидермальный фактор роста (Gibco; PHG0311), 10 нг/мл FGF β – фактор роста фибробластов (Gibco; PHG0023), 100X антибиотик-антимикотик, клетки оценивали на жизнеспособность окрашиванием 0,4% трипановым синим (Gibco; 15250-061) и производили подсчет клеток в камере Горяева. Клетки высевали на 25 см² культуральные флаконы из расчета 15×10^3 клеток на 1 см². Культуральную среду заменяли на новую каждые 4 сут. Культивирование продолжали до достижения 70% слоя конfluence. Затем клетки снимали при помощи ферментативной диссоциации 0,25% раствором трипсина 5 мин, при 37°C. Центрифугировали при 120g 3 мин, сливали супернатант и высевали в новые 25 см² культуральные флаконы с добавлением среды DMEM + 5% FBS + 100X антибиотик-антимикотик. Перед внесением в смешанную культуру клетки были обработаны флуоресцентным клеточным трейсером CFDA SE (Molecular Probes; V12883) в соответствии с рекомендациями производителя, либо флуоресцентным клеточным

трейсером RED CMTPX (Molecular Probes; C34552) в соответствии с рекомендациями производителя.

2.2. Флуоресцентные красители

В работе использованы прижизненные клеточные флуоресцентные красители CFDA SE (Molecular Probes; V12883) и RED CMTPX (Molecular Probes; C34552). Стратегическими преимуществами этих красителей является их пассивная диффузия в клетки, связывание с цитоплазматическими аминными белками и расщепление внутриклеточными эстеразами аминоксислота-карбоксивалероисцино-сукцинимидильного эфира, вследствие этого, при микроскопическом анализе визуализируется флуоресценция. Одним из важнейших свойств клеточных трейсеров CFDA SE, RED CMTPX является то, что флуоресцирующий краситель, связанный с белком, передается при митозе, слиянии клеток, отслеживании клеток *in vivo*, но важно, что он не проникает в близлежащие клетки. Удобный спектр флуоресценции (CFDA SE – 488 нм, CMTPX RED – 546 нм) позволяет легко визуализировать окрашенные клетки.

Методика окраски живых клеток прижизненным красителем Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Molecular Probes; V12883). При проведении окраски клеточных культур, в соответствии с рекомендациями производителя – компании Molecular Probes, готовили маточный 10 mM раствор, для чего сухой краситель разбавляли в чистом DMSO (SIGMA; D2650). Затем маточный раствор разводили в стерильном 1M PBS pH 7,4 (Gibco; 10010031) до необходимой концентрации (для клеток глиомы C6 – 25 μ M; ГСК и фибробласты крысы – 10 μ M). Клетки помещали в 15 мл фалькон со средой DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, центрифугировали при 120g 3 мин, сливали супернатант и добавляли раствор с красителем необходимой концентрации, предварительно нагретый до 37°C. Клетки окрашивали в CO₂-инкубаторе (для клеток глиомы C6 – 20 мин; ГСК и фибробласты крысы – 30 мин).

По истечении времени, клетки центрифугировали при 120g 4 мин, сливали супернатант, добавляли свежую среду DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, культивировали в течение 20 мин, в CO₂-инкубаторе, затем центрифугировали при 120g 4 мин. Сливали супернатант, добавляли среду DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, высаживали в 24-луночные культуральные планшеты (Greiner Bio One; 662160) и анализировали флуоресценцию клеток с использованием систем визуализации живых клеток LSM 5 Karl Zeiss Pascal и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 710 при стандартных наборах флуоресцентных фильтров на длине волны 488 нм.

Методика окраски живых клеток красителем CellTracker Red CMTPX Dye (C34552). Для визуализации в культуре клетки были обработаны флуоресцентным красителем Red CMTPX (C34552). При проведении окраски клеточных культур, в соответствии с рекомендациями производителя – компании Molecular Probes, готовили маточный 10 mM раствор, для чего сухой краситель разбавляли чистым DMSO (SIGMA; D2650). Затем маточный раствор разводили в среде DMEM до необходимой концентрации (для клеток глиомы C6 – 25 μM; ГСК и фибробласты – 10 μM).

Далее необходимую аликвоту клеток помещали в 15 мл фалькон со DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, центрифугировали при 120g 3 мин, сливали супернатант и добавляли раствор с красителем необходимой концентрации, предварительно нагретый до 37°C. Клетки окрашивали в CO₂-инкубаторе (для клеток глиомы C6 – 20 мин; ГСК и фибробласты – 30 мин).

По истечении времени, клетки центрифугировали при 120g 4 мин, сливали супернатант, добавляли свежую среду DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, культивировали в течение 20 мин, в CO₂-инкубаторе, затем снова центрифугировали при 120g 4 мин.

Повторно сливали супернатант, добавляли среду DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, высаживали в 24-луночные культуральные

планшеты (Greiner Bio One; 662160) и анализировали флуоресценцию клеток с использованием систем визуализации живых клеток LSM 5 Karl Zeiss Pascal и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 710 при стандартных наборах флуоресцентных фильтров при длине волны 546 нм.

2.3. Проточная цитофлуориметрия

Для подсчета клеток глиомы C6 и ГСК при совместном культивировании использовали метод проточной цитофлуориметрии. Для этого пробирку с клетками глиомы C6 оттаивали в 37°C 5 мин, переносили содержимое в 15 мл фалькон, добавляли свежей среды DMEM (Gibco; 11971025) с 10% FBS и 100X антибиотиком-антимикотиком (Gibco; 15240-062), центрифугировали при 120g 5 мин, сливали надосадочную жидкость, в фалькон добавляли свежей среды DMEM + 10% сыворотки (FBS; Gibco; 16000036) + антибиотик-антимикотик. Клетки оценивали на жизнеспособность окрашиванием 0,4% трипановым синим (Gibco; 15250-061) и считали в камере Горяева. Далее глиому C6 высаживали в 75 см² флаконы в количестве 10⁴ клеток на 1 см² и культивировали до 90% слоя конfluентности при 37°C и 5% CO₂. Перед экспериментом, культуру клеток подвергали диссоциации при помощи раствора TrypLe (Gibco; 12604-021) в течение 7 мин при 37°C, после клетки перемещали в 15 мл фалькон, добавляли свежей среды DMEM + 10% FBS + антибиотик-антимикотик, центрифугировали при 120g 5 мин и окрашивали флуоресцентным прижизненным трейсером RED CMTPX (Molecular Probes; C34552).

Пробирку с гемопоэтическими стволовыми клетками оттаивали в течение 5 мин при 37°C. Переносили содержимое в 15 мл фалькон, добавляли свежей среды DMEM + 10% FBS + антибиотик-антимикотик, центрифугировали при 120g 5 мин, затем окрашивали флуоресцентным прижизненным трейсером CFDA SE (Molecular Probes; V12883).

Далее глиому С6 и ГСК рассаживали в 12-луночные планшеты в соотношении 1:1 для совместного культивирования (по 4×10^4 клеток каждого вида в лунку). В качестве контроля высаживали ГСК и глиому С6 в отдельные лунки 12-луночного планшета. После определенного срока культивирования – 3 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч – клетки в каждой лунке планшета подвергали ферментативной диссоциации (350 мкл TrypLe, 5 мин), переносили в отдельные пробирки соответственно лунке, добавляли среду DMEM + 10% FBS, центрифугировали при 120g, 6 мин, сливали супернатант, затем в каждую пробирку добавляли PBS 0,1M 400 мкл и анализировали на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter.

2.4. Иммуноцитохимическое исследование

Для иммуноцитохимического исследования клеток глиомы линии С6, криопробирку извлекали из жидкого азота, размораживали 5 мин, в 37°C дистиллированной воде, переносили содержимое криопробирки в 15 мл фалькон, добавляли свежей среды DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик, центрифугировали при 120g 3 мин. Сливали супернатант, добавляли свежей среды DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик. Клетки оценивали на жизнеспособность окрашиванием 0,4% трипановым синим (Gibco; 15250-061). Подсчет клеток производили в камере Горяева, затем клетки рассаживали в 24-луночный планшет (Greiner bio one; 662160) по 25×10^3 клеток на лунку с добавлением среды DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотика. Культивировали в течение 2 сут. Клетки фиксировали по схеме: 4% ПФА (Sigma-Aldrich; P6148) – 20 мин, при 4°C, 3 раза по 10 мин, промывали PBS 0,1M pH 7,4 (Gibco; 10010031) + 0,2 % tween 20 (Sigma-Aldrich; P9416) + 0,2% triton-x-100 (Sigma-Aldrich; T8787) + бычий сывороточный альбумин (БСА) 0,3% (Sigma-Aldrich; A2058) далее – рабочий раствор PBS.

Иммуноцитохимическую окраску проводили по схеме: первичные антитела против Oligodendrocyte 4 (мышинные) 1:50 (R&G Systems;

MAВ1326); первичные антитела против GFAP (мышинные) 1:50 (Abcam; 7260); первичные антитела против p53 (мышинные) 1:100 (Novex; АНО0152); антитела против tubulin- β -III 1:100 (мышинные) (Abcam; 7751); первичные антитела против нестина 1:100 (кроличьи) (Sigma-Aldrich; 5413); первичные антитела против S100 1:100 (Abcam; ab868) (кроличьи); первичные антитела против CXCR4 1:100 (Abcam; ab2074) (кроличьи) в течение 18-20 ч., отмывали рабочим раствором 3 раза по 10 мин; вторичные антитела, конъюгированные с Alexa 488 1:500 (против мыши) (Novex; A11059), либо вторичные антитела, конъюгированные с Alexa 633 1:500 (против кролика) (Novex; A21071) – 2 ч при 37°C, отмывали рабочим раствором PBS 3 р., по 10 мин, ядра контрастировали DAPI (Molecular Probes; D1306) 7 мин при 22°C, отмывали рабочим раствором PBS 2 раза по 10 мин, заключали в mowiol (Sigma-Aldrich; 324590). Контроль на вторичные антитела Alexa 488 и Alexa 633 проводился без использования первичных антител. Первичные и вторичные антитела использовались в соответствии с рекомендациями производителя.

Для анализа флюоресценции и визуализации иммуноцитохимической окраски использовался конфокальный (лазерный сканирующий) микроскоп Zeiss LSM 710 META (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.5. Моделирование опухоли головного мозга

В экспериментальной нейроонкологии существует несколько способов моделирования опухолей: модели, вызванные химическими веществами; созданные при помощи генной инженерии, в том числе вирусно-индуцированные модели, ксенотрансплантные модели (Huszthy et al., 2012).

В данной работе использовали ксенотрансплантантную модель, преимущество которой состоит в попадании ОК в головной мозг по строго заданным координатам в определенный участок головного мозга при помощи стереотаксической имплантации, что гарантирует локализацию опухолевого очага.

Моделирование глиобластомы *in vivo* выполняли с помощью внутримозговой стереотаксической имплантации клеток крысиной глиомы линии С6. В работе, проведенной в два этапа, было использовано 230 половозрелых самок крыс общей массой 200-220 г в начале эксперимента. Животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения смеси содержащей Золетил 100 (Virbac) + Рометар (Bioveta) в соотношении 1:4 из расчета 10 мг/кг массы тела животного. В стерильных условиях рассекали мягкие ткани, в соответствии с ранее установленными координатами, накладывали трепанационное отверстие, используя микродрель производства Harvard Bioscience Company. Клетки вводили с помощью гамильтоновского шприца со скоростью 3 мкл/мин в область каудопутамена с помощью стереотаксического аппарата для крыс Narishige (Japan) по координатам атласа мозга крысы (Paxinos, Watson, 2007): Ap-1; L-3,0; V-4,5, TBS-2,4 мм. Все животные каждые 3 сут с начала эксперимента получали глюкокортикостероиды – дексаметазон (KRKA) в дозе 4 мг/кг массы тела животного.

2.6. Исследование функционального статуса крыс

Исследование проводилось по неврологическому протоколу Тупера и Валаса (Tupper, Wallace, 1980), которые разработали диагностику, схожую с клиническим неврологическим обследованием (табл. 1).

Измерение массы тела. Проводили с использованием лабораторных весов Sartorius CPA12001S. Животное аккуратно извлекали из клетки, помещали в чашу весов, затем снимали показания зафиксированного веса.

Химиотерапия. Золотым стандартом химиотерапии инвазивных глиом является темозоломид. В работе был использован цитостатический алкилирующий химиопрепарат с действующим веществом темозоломид, производства Shering-Plough Labo N.V. (Belgia) под торговым названием Temodal. На 10 сут после имплантации клеток глиомы животным проводили магнитно-резонансную томографию головного мозга (МРТ). При наличии

четко визуализируемой опухоли, животные соответствующих групп получали перорально темозоломид в дозе 50 мг/кг массы тела с 10 по 14 сут эксперимента.

Таблица 1 – Исследование по неврологическому протоколу Тупера и Валаса (Tupper, Wallace, 1980)

После проведения каждой процедуры выставляли баллы. Если у животного правильная реакция – 1 балл, если реакция иная или ее нет – 0 баллов. Баллы суммировались. Выставлялась общая оценка функционального статуса.	
1. Рефлекс на сгибание	Зажатие задней лапки пинцетом, норма реакции – одновременное отдергивание и сгибание лапки.
2. Хватательный рефлекс	Животное поднести к проволоке. Норма реакции – захват проволоки.
3. Рефлекс на переворачивание	Крысу кладут на спину (а) она сразу переворачивается; (б) тело и голова при попытке перевернуться движутся противоположно друг другу; (с) голова наклоняется в сторону, конечности движутся в противоположные стороны.
4. Тест на равновесие	Три этапа: (а) крыса находится вниз головой на проволочной платформе 30 градусов и пытается подняться вверх; (б) крысу помещают на платформу и она должна остаться там в течение 3 мин; (с) крыса на платформе, которая медленно вращается, животное должно остаться на платформе.
5. Рефлекс роговицы	Удерживая крысу слегка нажать на роговицы глаз – животное должно закрыть глаза.
6. Тест на слух	Пока крыса находится на ровной поверхности в спокойном состоянии, делают громкий хлопок – животное должно выгнуть тело и поджать к себе передние и задние лапки.

Магнитно-резонансная томография. МРТ головного мозга проводили на МР-томографе Biospec (Bruker) на базе центра коллективного пользования Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного

отделения Российской Академии Наук. МРТ выполняли с использованием стандартных режимов (взвешенный режим T1 и T4) на 10 сут эксперимента.

Измерение объема опухоли проводили по формуле: $V=4/3\pi abc$ где a,b,c – полуоси эллипсоида. Первоначально, находили срез с максимальной площадью глиомы, на котором определяли большую полуось (a) и малую полуось эллипсоида (b). Затем, путем суммирования толщины фронтальных срезов на расстоянии от переднего до заднего полюса опухолевого узла, находили переднезаднюю полуось (c). Статистический анализ проведен с использованием MS Excel 2010. Обработка изображений выполнена с использованием программы ImageJ (USA).

2.7. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование

Морфологическое исследование. Спустя 10, 14, 21, 28 и 35 сут после имплантации глиомы крыс глубоко наркотизировали и перфузировали трансаортально 4% ПФА. Для морфологического анализа тканей парафиновые срезы головного мозга толщиной 7 мкм депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином и 0,1% толуидиновым синим на 0,1 М ацетатном буфере pH 3,5 (BioOptica, Италия) по стандартной методике.

Иммуногистохимическое исследование. Животных анестезировали путем внутрибрюшинного введения смеси Золетил 100 (Virbac) + Рометар (Bioveta) в соотношении 1:4 из расчета 10 мг/кг массы животного, затем перфузировали трансаортально 4% ПФА. Для оценки активности глиальных клеток головного мозга, пораженного опухолью С6, использовали метод иммунопероксидазной реакции выявления ряда глиальных и пролиферативных маркеров. Использованный в работе иммуногистохимический метод состоит из этапов: фиксация кусочков ткани (4% ПФА) в течение 12 ч с последующей промывкой PBS; заливка в парафин по стандартной методике; получение серийных парафиновых срезов толщиной 7 мкм; прединкубация в растворах, блокирующих эндогенную пероксидазную активность и неспецифическое связывание антител;

обработка срезов в растворе первичных антител (4°C, 24 ч); обработка вторичными антителами и постановка иммунопероксидазной реакции. В работе использованы первичные поликлональные мышьиные и кроличьи антитела против GFAP – глиального кислого фибриллярного белка (Vector Laboratories; G 805), iba-1 – микроглия/макрофаг-специфического белка (Abcam; 107159), PCNA – ядерного антигена пролиферирующих клеток (Abcam; ab29) в разведении 1:200, 1:300 и 1:2000 соответственно. Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена PI-1000 (anti-rabbit); PI-2000 (anti-mouse) 1:300), фирмы Vector Laboratories использовались в соответствии с инструкциями фирмы производителя. Для проведения иммунопероксидазной реакции использовали хромоген NovaRED substrate kit (Vector Laboratories; SK-4800). Затем срезы тщательно отмывали 0,1М PBS, обезвоживали и заключали в бальзам по стандартной методике.

Препараты просматривали в световом микроскопе Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

2.8. Эксперимент по взаимодействию стволовых и опухолевых клеток *in vitro*

Для выявления антипролиферативного эффекта гемопоетических стволовых клеток в отношении глиомы C6 *in vitro* производили подсчет количества опухолевых клеток при совместном культивировании. Для этого культуру клеток ГСК и фибробластов вносили в соотношениях 1:1, 1:3, 3:1 в культуру глиомы C6 в 24-луночные планшеты, содержащие DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик и культивировали 120 ч. Количество клеток определяли по числу флуоресцирующих объектов с помощью системы Cell-IQ (CM Technologies) в полностью автоматизированном режиме, полученные данные подвергали статистической обработке методом вариационной статистики, рассчитывали стандартное отклонение и критерий достоверности с помощью программы MS Excel (2010).

Для выявления особенностей антипролиферативного действия гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы C6 *in vitro* эксперимент был поставлен в 3 этапа:

На первом этапе окрашенные трейсером CFDA SE (Molecular Probes; V12883) ГСК вносили в неокрашенную культуру клеток глиомы C6 в соотношении 3:1; 1:1; 1:3 в 24-луночные планшеты (Greiner Bio-One; 662160), которые затем заполняли DMEM + 10% FBS + 100X антибиотик-антимикотик. Клетки инкубировали при температуре 37°C и 5% CO₂ 120 ч.

На втором ГСК человека окрашивали трейсером RED CMTPX (Molecular Probes; C34552), вносили их в культуру с опухолевыми клетками, окрашенными CFDA SE в соотношении 3:1; 1:1; 1:3 и культивировали 120 ч.

На третьем этапе ГСК окрашивали CFDA SE и вносили в культуру опухолевых клеток, окрашенных RED CMTPX в соотношении 3:1; 1:1; 1:3 и культивировали 120 ч.

Взаимодействие клеток определяли путем перехода флуоресцентных красителей при помощи уникальной системы мультифотонной лазерной микроскопии производства компании Olympus. В работе также использована система визуализации живых клеток LSM 5 Karl Zeiss Pascal.

2.9. Эксперимент *in vivo*

Эксперимент был поставлен в три этапа.

На первом этапе проводили подбор оптимального количества клеток для создания модели опухоли головного мозга у лабораторных крыс. Для этого было использовано 50 самок крыс породы Вистар массой 200-220 г в начале эксперимента. По количеству вводимых клеток животные были разделены на три группы. Крысам первой группы (N=15) было введено 2×10^5 клеток глиомы линии C6. Крысам второй группы (N=15) имплантировано 5×10^5 , а крысам третьей группы (N=15) – 2×10^6 опухолевых клеток. В качестве контроля 5 крысам в область каудапутамена было введено 10 мкл физраствора (NaCl).

На втором этапе были проведен эксперимент по миграции ГСК в зону опухоли, вызванную стереотаксической имплантацией глиомы С6 в головной мозг самок крыс с массой тела 200-220 г. Эксперимент был выполнен на 90 крысах породы Вистар. Спустя 10 сут после моделирования опухоли, крысам, находящимся под кратковременным наркозом Севоран (Abbott Laboratories) вводили ГСК в количестве 4×10^5 в 400 мкл физраствора (NaCl) в хвостовую вену. Крысы были разделены на три группы: группа С6+ГСК (N=30) – крысы, с глиомой С6 и введением окрашенных флуоресцентным красителем CFDA SE ГСК в хвостовую вену; группа С6 (N=30) – крысам моделировали глиому и на 10 сут вводили в хвостовую вену NaCl; группа контроль – интактные крысы (N=30). Миграцию клеток исследовали на 3, 5 и 7 сут после введения ГСК при помощи гистологического анализа головного мозга крыс. Оценку функционального статуса крыс (таблица 1) проводили по неврологическому протоколу Тупера и Валаса (Tupper, Wallace, 1980).

На третьем этапе эксперимент был выполнен на 90 половозрелых самках крыс породы Вистар массой тела 200-220 г в начале эксперимента. Животные были разделены на три группы. Контрольную группу составили животные с глиомой С6 – группа «Контроль» (N=30). Вторая группа сформирована из крыс с глиомой, которым была проведена терапия темозоломидом в дозе 50 мг/кг массы животного с 10 по 14 сут после имплантации опухолевых клеток – группа «темозоломид» (N=30). Третья группа состояла из крыс с глиомой С6, которым после терапии темозоломидом в дозе 50 мг/кг массы животного с 10 по 14 сут, проводилась трансплантация ГСК в хвостовую вену в количестве 4×10^5 – группа «Темозоломид + клетки» (N=30).

Максимум внимания был уделен продолжительности жизни животных. При ухудшении состояния крыс выводили из эксперимента путем глубокого наркоза. Эксперимент был повторен три раза. Часть крыс из каждой группы (N=3) была исследована на миграцию ГСК, введенных в системный кровоток на 3, 5 и 7 сут после введения ГСК. Содержание и уход за животными

осуществлялся в соответствии с требованиями стандартов GLP и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Экспериментальная часть работы, в том числе использование человеческого материала для исследовательских целей, была одобрена этическим комитетом ИБМ ДВО РАН.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Антипролиферативный эффект гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы С6 *in vitro*

Применение СК в комплексном лечении злокачественных опухолей в 60-х г. 20-го века было революционным научным событием. Сегодня СК широко применяются в онкологии и регенеративной медицине. Но чем шире становится спектр применения СК, тем острее встает вопрос об их истинной роли в развитии злокачественных опухолей. Поэтому необходимо накопление знаний о фундаментальных механизмах взаимодействия стволовых и опухолевых клеток.

Автоматизированный подсчет количества опухолевых клеток в сочетанных культурах с помощью системы Cell-IQ выявил ряд важных закономерностей. Кривая нарастания числа опухолевых клеток в сочетанной культуре ГСК/С6 при изначальном соотношении – 1:3, к концу эксперимента имела экспоненциальный вид, но обнаруживала выраженные количественные отличия от культур содержащей фибробласты и клетки глиомы С6 (рисунок 1А).

Эти различия были более очевидны при культивировании ГСК с клетками нейроглиомы линии С6 в соотношении 1:1 и 3:1(рисунок 1Б, В).

Кривая нарастания числа опухолевых клеток в этих кокультурах была линейной, а существенные различия в числе опухолевых клеток в сочетанных культурах ГСК/С6 и ГСК/фибробласты к концу эксперимента позволяют сделать вывод о выраженном противоопухолевом действии ГСК. Однако уменьшение числа флуоресцирующих объектов может объясняться спецификой процесса межклеточных коммуникаций, в ходе которого происходит обмен цитоплазматическими белками, с которыми связан краситель, что уменьшает интенсивность флуоресценции.

Однако анализ динамики нарастания числа опухолевых клеток при совместном культивировании с ГСК, позволяет сделать вывод об усилении

их антагонистического действия на рост глиомы по мере увеличения числа стволовых клеток. Кроме того, увеличение количества ГСК отодвигает фазу логарифмического роста опухолевой культуры во времени (рисунок 1Г).

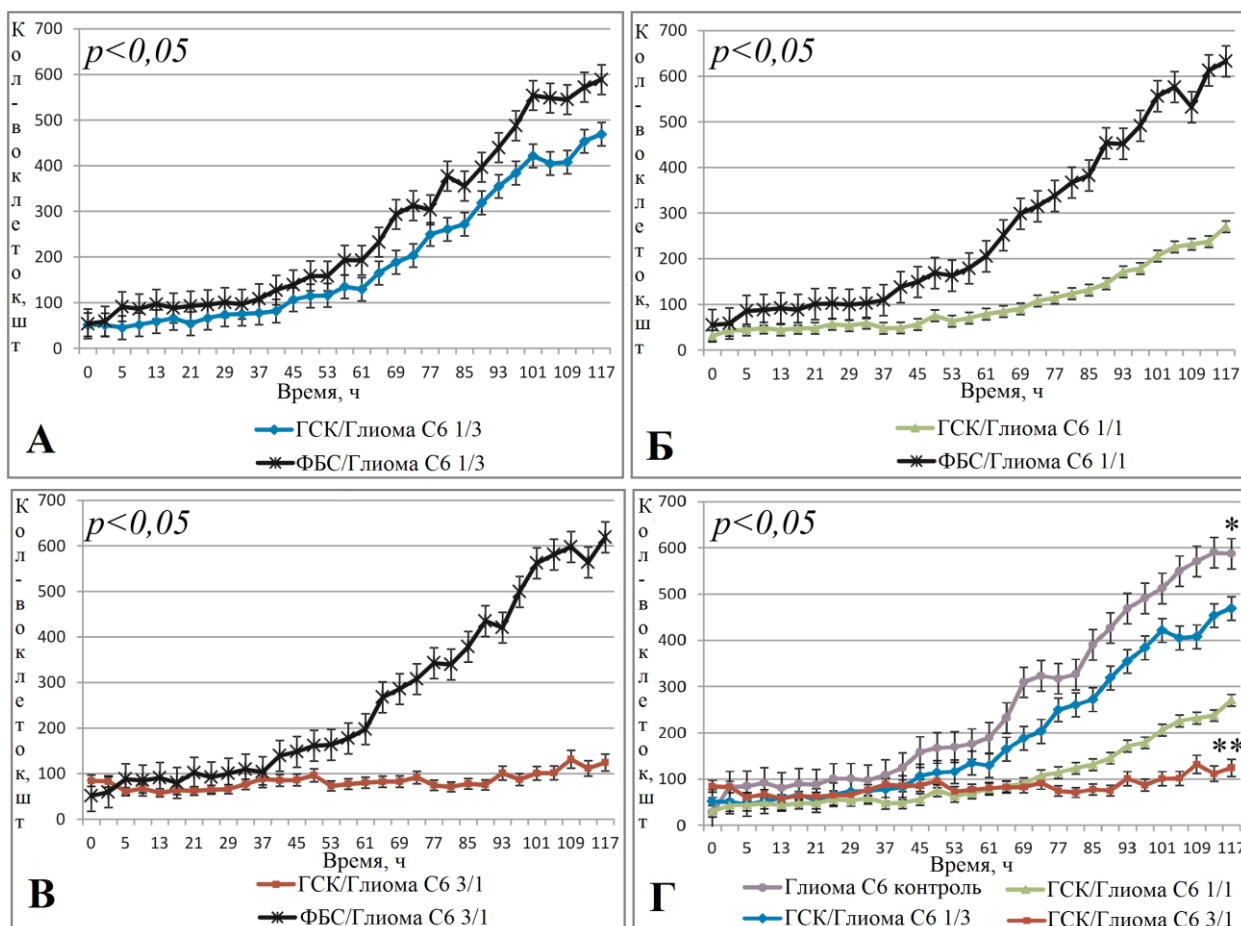


Рисунок 1 – Динамика роста опухолевых клеток в кокультурах. А – клетки глиомы С6 в сочетанных культурах с ГСК и фибробластами (ФБС) в соотношении 1:3. Б – клетки глиомы С6 в сочетанных культурах с ГСК и фибробластами в соотношении 1:1. В – клетки глиомы С6 в сочетанных культурах с ГСК и фибробластами в соотношении 3:1. Г – динамика роста клеток глиомы в кокультурах с ГСК в соотношениях 1:1, 1:3, 3:1. Указаны планки стандартного отклонения.

Таким образом, ГСК активно взаимодействуют с опухолевыми клетками при совместном культивировании, что тормозит пролиферацию опухолевых клеток, отодвигает во времени фазу логарифмического роста. Ингибирующее воздействие на репликацию клеток глиомы становится более очевидным по мере увеличения численности ГСК. Особенностью противоопухолевых эффектов ГСК являются регуляторные межклеточные взаимодействия и обмен цитоплазматическими белками, однако нельзя

исключить слияния взаимодействующих клеток, что дает возможность прямого эпигенетического перепрограммирования клеток глиомы транскриптомными факторами цитоплазмы ГСК.

3.2. Особенности антипролиферативного действия гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы C6 *in vitro*

На первом этапе нашего эксперимента ГСК были внесены в неокрашенную культуру клеток глиомы. Через 1 ч культивирования при воздействии лазера с длиной волны 488 нм, мы визуализировали клеточную линию ГСК в виде флуоресцирующих объектов округлой формы (рисунок 2А), также хорошо визуализировались клетки глиомы в виде округлых, веретеновидных и полигональных образований в фазовом контрасте.

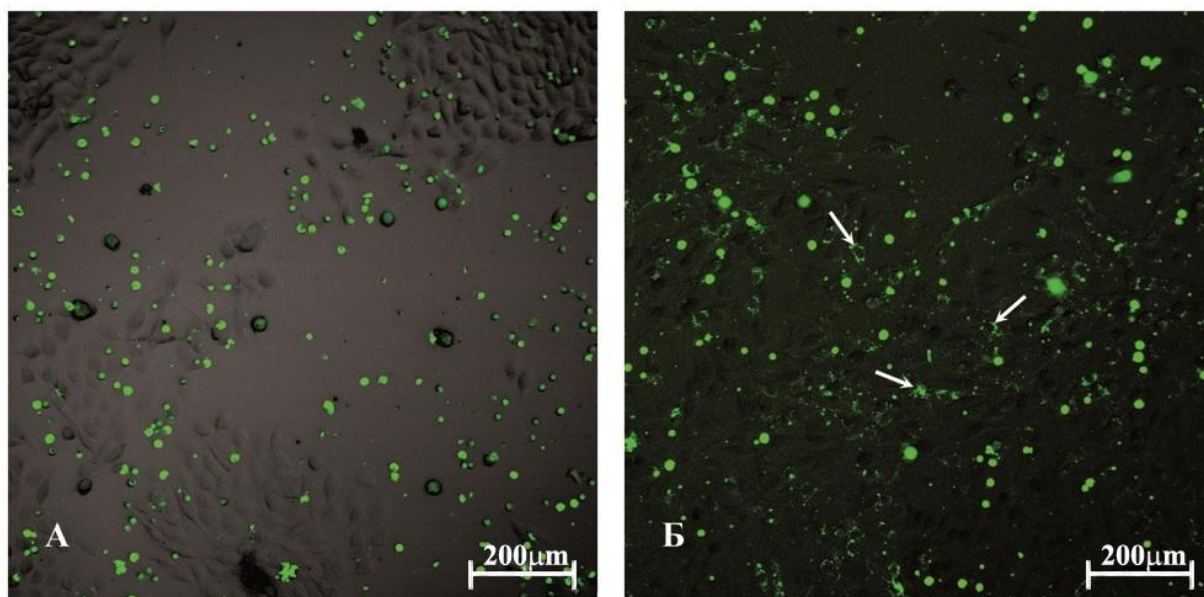


Рисунок 2 – Взаимодействие ГСК и опухолевых клеток глиомы C6 *in vitro*. А – флуоресценция ГСК (окрашены красителем CFDA SE, $\lambda=488$ нм) в культуре опухолевых клеток C6 (неокрашены) через 1 ч кокультивирования. Конфокальная сканирующая микроскопия. Первый этап эксперимента. Б – накопление красителя CFDA SE клетками глиомы C6, спустя 72 ч (белые стрелки). Изначально краситель содержался в ГСК. Конфокальная сканирующая микроскопия. Первый этап эксперимента.

Через 24 ч с начала эксперимента, в цитоплазме опухолевых клеток, культивируемых совместно с ГСК, стали определяться включения зеленого

флуорохрома красителя CFDA SE, через 48 ч большая часть опухолевых клеток была окрашена трейсером, изначально присутствующих в ГСК, а спустя 72 ч практически все клетки глиомы содержали в цитоплазме включения зеленого красителя (рисунок 2Б). Через 96 ч наблюдений клетки глиомы в сочетанной культуре С6/ГСК отвечали активной флуоресценцией на стимуляцию лазера с длиной волны 488 нм. Спустя 120 ч наблюдения мы не могли идентифицировать ГСК в смешанной культуре, что может объясняться их дифференцировкой, гибелью или слиянием с опухолевыми клетками.

На втором этапе эксперимента мы вносили ГСК, окрашенные флуоресцентным маркером RED CMTPX в культуру опухолевых клеток, с окраской трейсером CFDA SE. Спустя 1 ч культивирования, мы наблюдали флуоресценцию ГСК в спектре лазера 546 нм и культуру С6 при воздействии длины волны 488 нм (рисунок 3А, Б). Через 24 ч мы наблюдали накопление клеточного красителя в клетках глиомы С6 (рисунок 3В). Данное явление было максимально выражено спустя 72, 96 ч эксперимента (рисунок 3Г). Через 120 ч ГСК в смешанной культуре обнаружить не удалось.

На третьем этапе эксперимента мы внесли маркированные CFDA SE ГСК в культуру опухолевых клеток, окрашенных трейсером RED CMTPX. Спустя 1 ч визуализировали смешанную культуру, где четко различались опухолевые клетки в виде образований округлой и веретеновидной формы, отвечающие на воздействие лазера 546 нм и гемопоэтические стволовые клетки округлой формы, флуоресцирующие при длине волны 488 нм (рисунок 4А).

Через 24 ч в цитоплазме клеток глиомы С6, которые культивировались совместно с ГСК, стали появляться включения зеленого красителя (рисунок 4Б), спустя 48 ч включения зеленого флуорохрома содержала большая часть опухолевых клеток (рисунок 4В). Через 72 ч совместного культивирования на воздействие лазера с длиной волны 488 нм отвечала вся культура клеток глиомы С6, визуализировались единичные ГСК (рисунок 4Г). Спустя 120 ч

наблюдения мы не могли идентифицировать ГСК в кокультуре с опухолевыми клетками, поскольку все клетки отвечали активной флуоресценцией на воздействие лазеров двух типов.

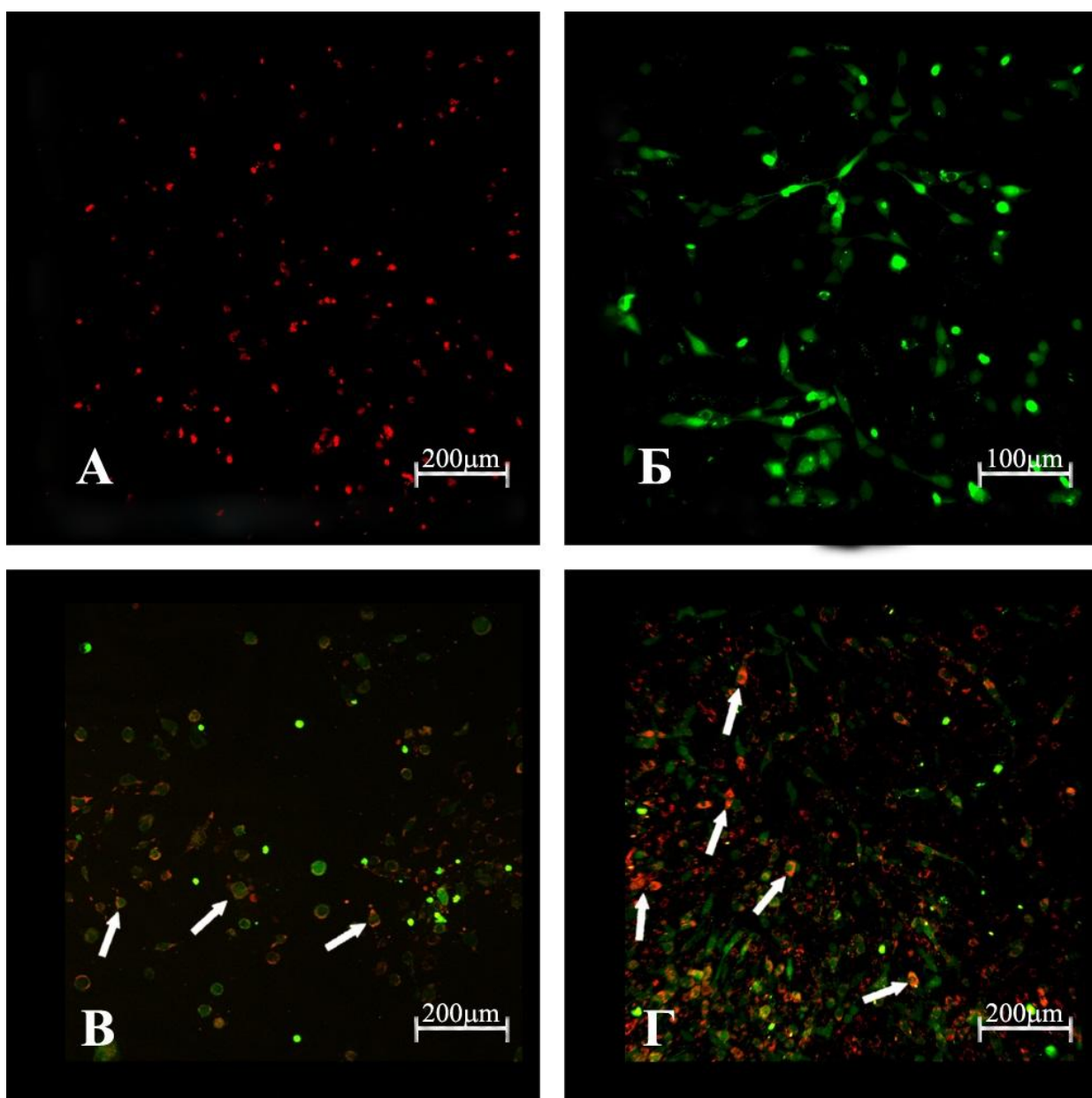


Рисунок 3 – Взаимодействие ГСК и опухолевых клеток глиомы С6 *in vitro*. А – флуоресценция ГСК, окрашенных RED CMTPX (красный) через 1 ч совместного культивирования. Б – флуоресценция глиомы С6, окрашенных CFDA SE (зеленый) через 1 ч совместного культивирования. В – накопление красителя RED CMTPX (красный) клетками глиомы С6, спустя 24 ч совместного культивирования с ГСК. Г – накопление красителя RED CMTPX (красный) клетками глиомы С6, спустя 72 ч совместного культивирования. Большая часть клеток глиомы С6 отвечает интенсивной флуоресценцией на $\lambda=546$ нм. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Второй этап эксперимента.

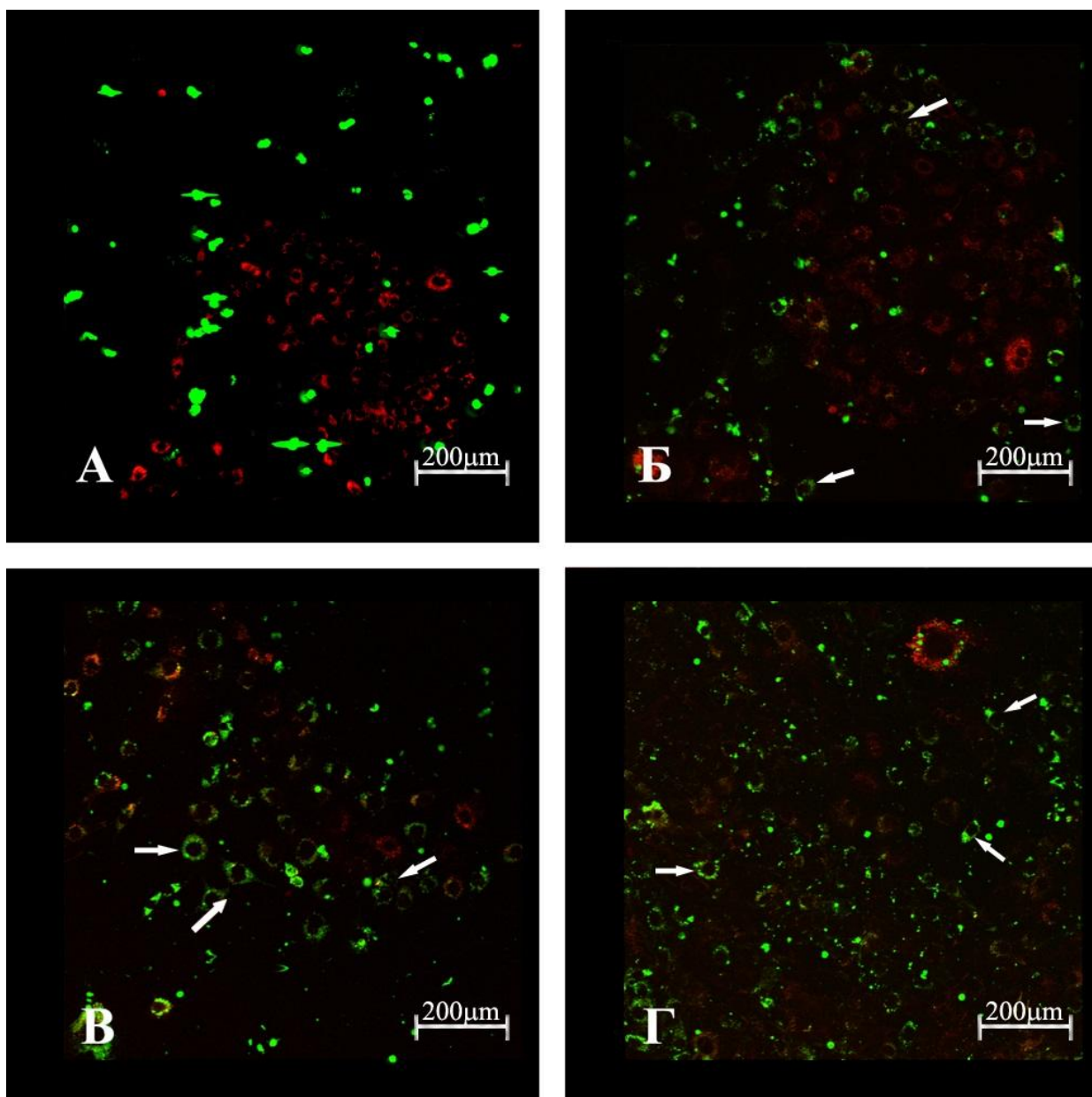


Рисунок 4 – Взаимодействие ГСК и опухолевых клеток глиомы С6 *in vitro*. А – сочетанная культура ГСК, окрашенных CFDA SE (зеленый) и клеток С6, окрашенных RED CMTPX (красный) через 1 ч совместного культивирования. Б – флуоресценция клеток глиомы С6, окрашенных RED CMTPX (красный) и ГСК, окрашенных CFDA SE (зеленый), спустя 24 ч совместного культивирования. В – накопление красителя CFDA SE (зеленый) клетками глиомы С6, спустя 48 ч совместного культивирования с ГСК. Г – большая часть клеток глиомы С6 через 72 ч эксперимента отвечают интенсивной флуоресценцией на $\lambda=488$ нм. Встречаются единичные ГСК. Конфокальная сканирующая микроскопия. Третий этап эксперимента.

По результатам анализа по совместному культивированию ГСК и клеток глиомы С6 в соотношении 1:1, проведенного на проточном

цитофлуориметре Beckman Coulter на сроках 24, 48, 72, 96 ч нами было показано, что активное взаимодействие клеток происходит на сроках 24-48 ч (рисунок 5А, Б).

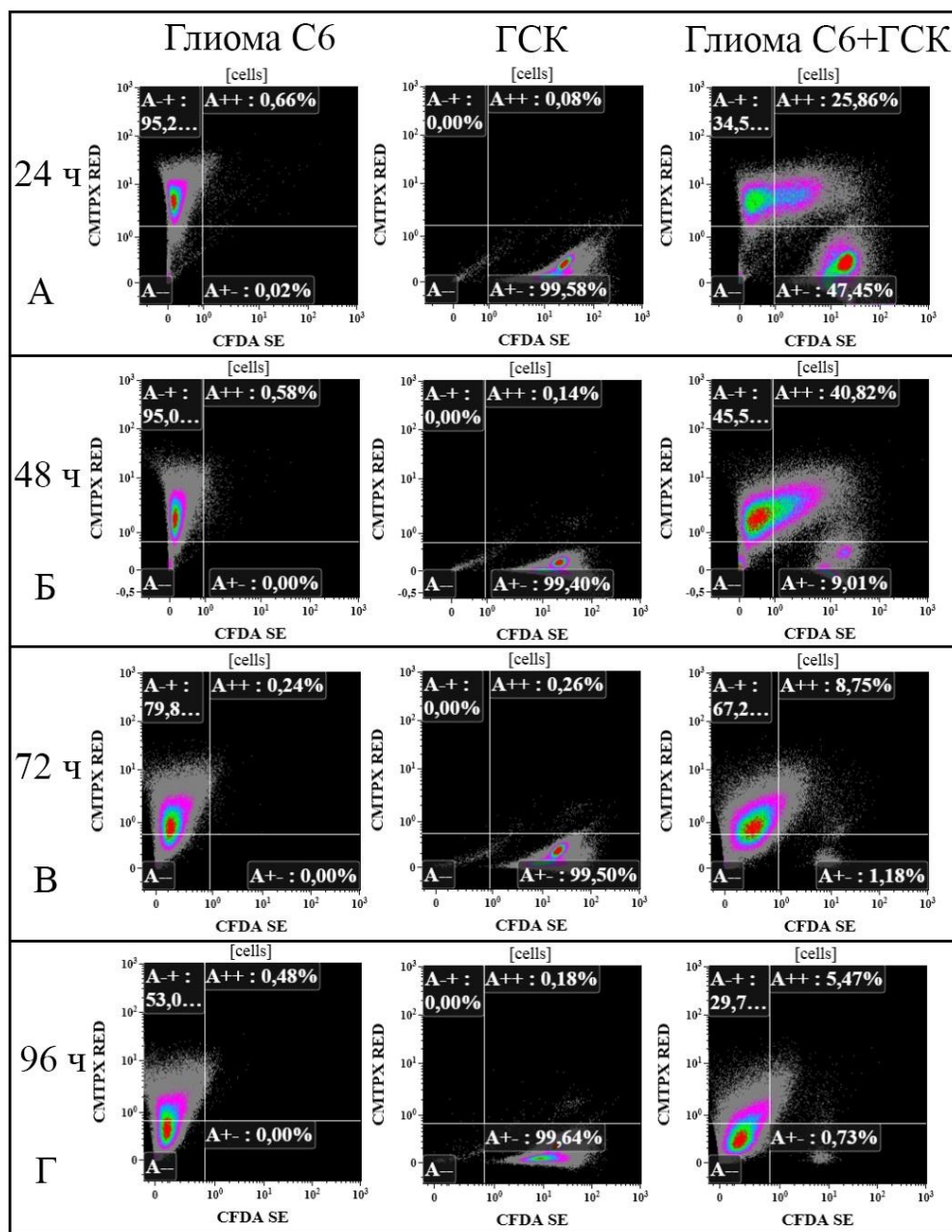


Рисунок 5 – Проточная цитофлуориметрия. Совместное культивирование ГСК (окрашены CFDA SE, $\lambda = 488$ нм) и глиомы С6 (окрашены CMTPX RED, $\lambda = 546$ нм) при изначальном соотношении 1:1. А – клетки, окрашенные CFDA SE, $\lambda = 488$ нм, А+ – клетки, окрашенные CMTPX RED, $\lambda = 546$ нм, А – – клетки погибшие либо потерявшие окраску. А++ – область с клетками, включившими окраску как CMTPX RED, $\lambda = 546$ нм, так и CFDA SE, $\lambda = 488$ нм. Для контроля использованы чистые клеточные культуры ГСК и глиомы С6, окрашенные маркерами CMTPX RED, $\lambda = 546$ нм и CFDA SE, $\lambda = 488$ нм соответственно. А – анализ клеток через 24 ч. Б – анализ клеток через 48 ч. В – анализ клеток через 72 ч. Г – анализ клеток через 96 ч.

Мы наблюдали популяцию клеток, содержащих двойную окраску на 24 ч совместного культивирования, процент которой составлял $26,31 \pm 1,79$, на сроке 48 ч – $36,81 \pm 4,61\%$, на 72 ч – $7,24 \pm 2,05\%$, а на 96 ч – $4,3 \pm 1,22\%$ (таблица 2). По мере увеличения срока культивирования наблюдалась тенденция к исчезновению ГСК в смешанной культуре, так на сроке 24 ч количество ГСК составляло 47,45%, на 48 ч – 9,01%, к 72 ч этот показатель составил 1,18%, а к 96 ч количество ГСК в кокультуре было 0,73% (рисунок 5В, Г). Причем в контролях, количество ГСК, как и количество клеток глиомы С6 закономерно увеличивается (рисунок 5А-Г).

Таблица 2. Результаты проточной цитофлуориметрии совместного культивирования глиомы С6 и ГСК в соотношении 1:1. Указано процентное соотношение клеток, содержащих оба флуоресцентных красителя – CFDA SE и CMTPX RED

Время, ч	Контроль глиома С6, %	Контроль ГСК, %	Глиома С6+ГСК 1:1, %
24	$0,66 \pm 0,15$	$0,08 \pm 0,01$	$26,31 \pm 1,79$
48	$0,58 \pm 0,13$	$0,14 \pm 0,03$	$36,81 \pm 4,61$
72	$0,24 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,05$	$7,24 \pm 2,05$
96	$0,48 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,04$	$4,3 \pm 1,22$

Примечание: $p < 0,05$

Таким образом, нами был выявлен переход красителя от ГСК и накопление цитоплазматического трейсера в опухолевых клетках на ранних сроках совместного культивирования (24 ч, 48 ч). На более поздних сроках (72, 96 ч) клетки глиомы С6 максимально накапливали клеточный трейсер от ГСК. Данные перехода красителя были подтверждены методом проточной цитофлуориметрии: на ранних сроках выявлена популяция клеток, флуоресцирующая по двум красителям (CFDA SE, CMTPX RED). Причем как по результатам визуализационного метода с помощью лазерного сканирующего микроскопа, так и методом проточной цитофлуориметрии было установлено, что популяция клеток ГСК при совместном

культивировании с глиомой С6 практически исчезла на поздних сроках (120 ч).

3.3. Экспериментальная модель злокачественной глиальной опухоли головного мозга *in vitro* и *in vivo*

3.3.1. Морфологическая характеристика модели *in vitro*

При культивировании *in vitro* клетки глиомы линии С6 отличаются разнообразием формы и количеством ядер. Клетки глиомы С6, используемые для моделирования опухолей, были морфологически не однородны (таблица 3), наиболее что среди клеток глиомы встречаются морфологические элементы полигональной формы, что наиболее характерно для клеток нейроэпителиального ряда, главным образом, молодых клеток астроцитарного ряда (рисунок 6).

Таблица 3 – Морфологическая характеристика клеток глиомы С6 *in vitro*

Морфологический тип	Количество опухолевых клеток, %
Клетки веретеновидной формы	32,4±2,8
Клетки полигональной формы	43,2±3,7
Клетки формы «яичница-глазунья»	24,4±3,7

В процессе культивирования *in vitro* клетки веретеновидной формы образовывали контакты с другими клетками в культуре, что свидетельствует об их активном участии в процессах межклеточной коммуникации. Часть клеток глиомы быстро адгезировала ко дну культурального флакона, распластывалась и формировала характерный морфологический тип, известный как «яичница-глазунья».

Однако пролиферирующие опухолевые клетки представляют собой сложную и исключительно динамичную систему. Поскольку большинство клеток глиомы С6 обладают характеристиками стволовых клеток, то, возможно, их первичные морфологические модификации отчасти

объясняются влиянием внешних факторов или воздействием внутренних механизмов.

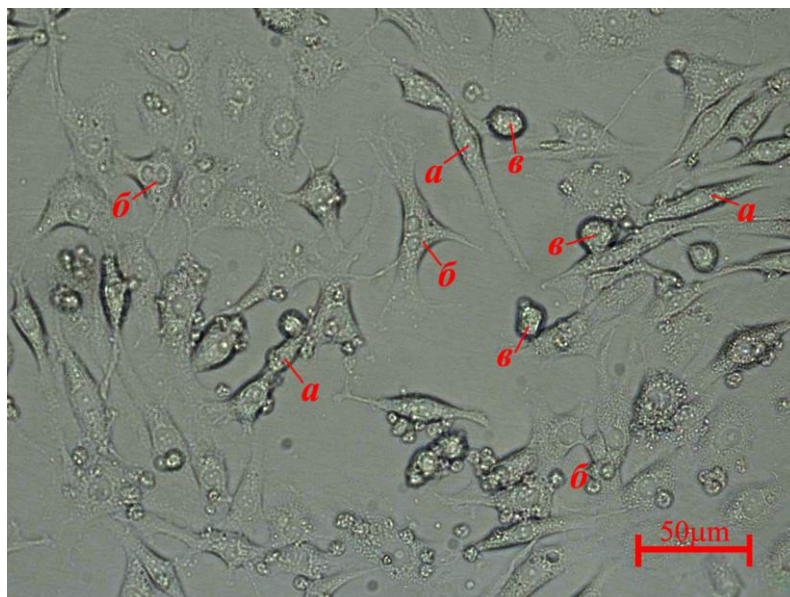


Рисунок 6 – Морфологические особенности клеток глиомы линии С6. *a* – клетки веретеновидной формы; *б* – клетки полигональной формы; *в* – клетки формы «яичница-глазунья». Фазовый контраст.

Однако пролиферирующие опухолевые клетки представляют собой сложную и исключительно динамичную систему. Поскольку большинство клеток глиомы С6 обладают характеристиками стволовых клеток, то, возможно, их первичные морфологические модификации отчасти объясняются влиянием внешних факторов или воздействием внутренних механизмов. Отсутствие строгого генетического контроля, высокие темпы пролиферации, в ситуации ограниченности ресурсов, быстро задают им совершенно иной вектор морфологии, обусловленный жесткими конкурентными условиями среды. В этом ключе высокое число неопластических (раковых) стволовых клеток выступает как дополнительный модифицирующий фактор.

3.3.2. Иммуноцитохимическая характеристика модели *in vitro*

Одной из фундаментальных задач экспериментальной биологии и медицины является идентификация клеток, запускающих и поддерживающих

опухолевый рост. Однако наряду с многочисленными исследованиями, проводимыми научными группами по этому вопросу, отсутствуют точные данные о количестве ОСК в глиальной опухоли и их принципиальных отличиях от нормальных стволовых клеток, а также от опухолевых клеток других типов.

В нашем исследовании основная часть клеток глиомы С6 ($96\% \pm 6,8$) окрашивалась антителами к нестину – одному из ключевых маркеров стволовых клеток нейрального ряда (рисунок 7А, таблица 4). Нестин – белок промежуточных филаментов, его количество закономерно снижается по мере дифференцировки клеток в нейрональном направлении. Распределение и экспрессия нестина в митотически активных клетках свидетельствует, что культура глиомы С6 содержит предельно высокое число низко дифференцированных клеточных элементов, обладающих очень высокой митотической активностью.

Определенная популяция клеток глиомы линии С6 окрашивалась антителами к белку Olygodendrocyte 4 ($46\% \pm 3,7$) (рисунок 7Б, таблица 4) и кальций-связывающему белку астроцитарной глии – S100 ($76\% \pm 5,3$) (рисунок 7Г, таблица 4). Данное обстоятельство свидетельствует о принадлежности линии глиомы С6 к клеткам нейроэпителиального ряда. Маркер Olygodendrocyte 4 представляет собой мембранный антиген клеток-предшественников ранних олигодендроцитов. В свою очередь, S100 – это группа уникальных для нервной ткани кислых кальций-связывающих белков. Они синтезируются глиальными клетками и транспортируются в нейроны, где локализуются в цитоплазме, а также в синаптической мембране и хроматине. Белки S100 вовлечены в процессы, транскрипции, организации мембран, регуляции клеточного цикла и динамики цитоскелета, считаются маркером повреждения мозга и выявляются у больных злокачественной меланомой.

Около половины опухолевых клеток С6 ($55,8\% \pm 4,8$) окрашивается антителами к белку Tubulin- β -III, который представляет собой основной

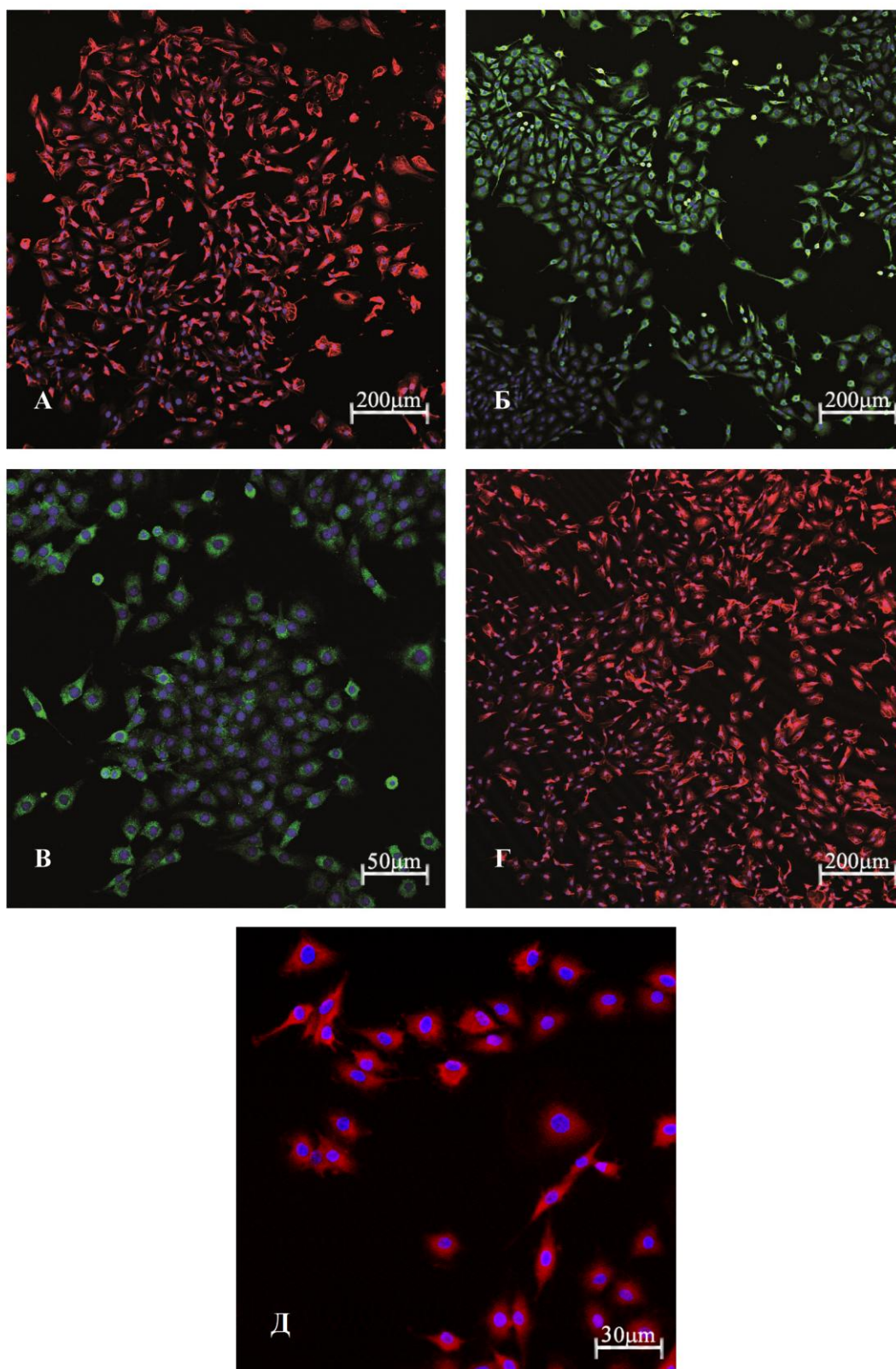


Рисунок 7 – Иммуноцитохимическая характеристика клеток глиомы С6 в культуре. А – окраска антителами к нестину. Ядра окрашены DAPI. Б – окраска антителами к Oligodendrocyte 4. Ядра окрашены DAPI. В – окраска антителами к tubulin- β -III. Ядра окрашены DAPI. Г – окраска антителами к белку S100. Ядра окрашены DAPI. Д – окраска антителами к CXCR4. Ядра окрашены DAPI.

компонент микротрубочек, формирующих цитоскелет. Tubulin- β -III является тканеспецифическим маркером молодых нейронов (рисунок 7В, таблица 4).

Часть популяции клеток ($19,63\% \pm 4,92$) глиомы окрашивалась к антителам против CXCR4 (рисунок 7Д, таблица 4), который является рецептором фактора миграции стволовых клеток хемокина SDF-1 и представлен более чем 20 видами раковых опухолей. Кроме того, белок-лиганд CXCR4 – CXCL12, опосредует специфический ответ в пролиферирующих клетках глиом, таким образом, CXCR4 играет существенную роль в инициации и обновлении клеток глиомы.

Положительная реакция к белку GFAP – кислому глиальному фибриллярному белку промежуточных филаментов (рисунок 8Б, таблица 4), также свойственна определенной части глиомных клеток С6 ($38\% \pm 4,6$). Данный белок является одним из основных маркеров астроцитарной глии, участвует в важных процессах, таких как межклеточное взаимодействие и функционирование гематоэнцефалического барьера, играет важную роль при митозе. GFAP помогает поддерживать механическую прочность и форму клеток, но его точная функция остается плохо изученной.

Описанные обстоятельства позволяют рассматривать клетки глиомы С6 как тканеспецифические нейральные (нейроэпителиальные) стволовые клетки. Глиомные клетки С6 активно окрашиваются антителами к мутантному белку p53 (рисунок 8А, таблица 4), что отвечает на вопрос об их принципиальных отличиях от здоровых тканеспецифических стволовых клеток. Биологическая роль белка p53 заключается в обеспечении генетической однородности клеток в организме. p53 – важнейший регулятор клеточного цикла, известный как «страж генома». В норме этот белок считается онкосупрессором. Судьба клетки определяется в зависимости от уровня и активности p53, что в свою очередь зависит от исправности других механизмов, регулирующих клеточную активность. Белковая молекула p53 способствует отслеживанию, оцениванию и координированию практически всех внутриклеточных процессов. При отсутствии повреждений

генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК, активируется. Данный механизм состоит в приобретении способности связываться с ДНК и запускать транскрипцию генов, которые содержат в регуляторной области нуклеотидную последовательность, которая называется p53-response element. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК, а при сильном стрессовом сигнале запускается программа апоптоза.

Большое количество p53 ($88\% \pm 3,8$) в клетках глиомы линии С6 свидетельствует о высокой скорости пролиферации опухолевых клеток (таблица 4). Накопление этого белка в клетке при подготовке к митозу представляет собой исторически сложившийся защитный механизм на возможное повреждение ДНК. Модификации клеточного протеома как неизбежное следствие накопления клетками генетических мутаций, способствуют приобретению p53 новых функций, которые позволяют клетке с поврежденным геномом преодолевать контрольные точки клеточного цикла и пролиферировать, приобретая устойчивость к внешним воздействиям. Контрольное окрашивание культуры клеток С6 вторичными антителами Alexa 488 и Alexa 633 без использования первичных антител показало, что флуоресценция при воздействии лазера с $\lambda=488$ нм и $\lambda=633$ нм соответственно отсутствует (рисунок 8В, Г). Как следует из результатов иммуноцитохимического анализа, клетки глиомы линии С6 можно охарактеризовать как генетически измененные нейральные стволовые, содержащие мутацию гена p53 (таблица 4).

Родство нейральных стволовых клеток с ОСК злокачественных новообразований нейроэпителиального ряда очевидно. Эти клеточные системы характеризуются общностью иммуноцитохимических маркеров клеточной поверхности, единством генетических и эпигенетических механизмов, регулирующих основные жизненные процессы, сходством

Таблица 4 – Иммуноцитохимическая характеристика клеток глиомы С6

Иммуноцитохимический маркер	Количество клеток, %
Нестин	96,7±6,8
Oligodendrocyte 4	46,2±3,7
S100	76,3 ±5,3
CXCR4	19,63±4,92
Tubulin-β-III	55,2±4,8
GFAP	38,2±3,5
p53	88,4±3,8

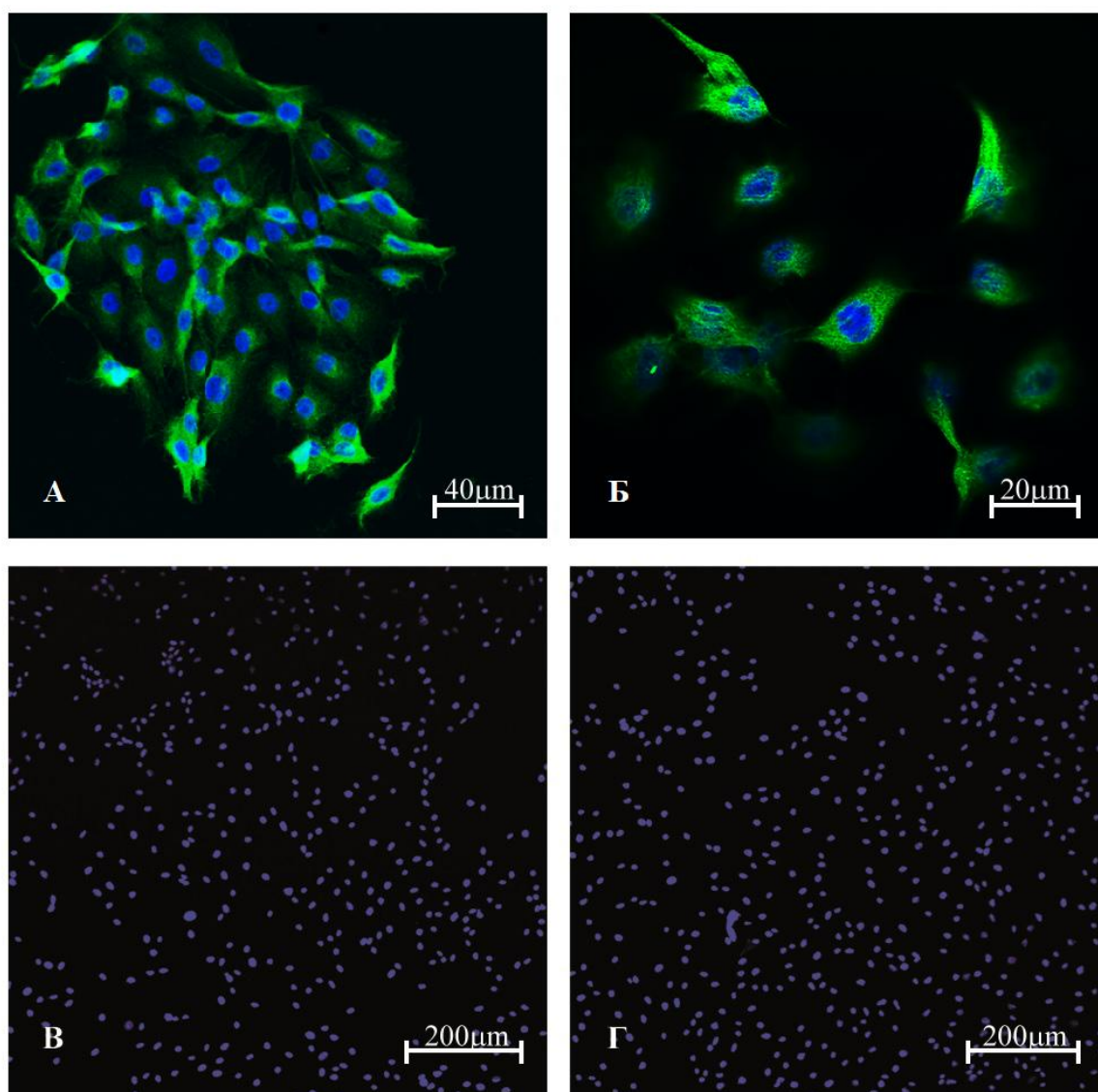


Рисунок 8 – Иммуноцитохимическая характеристика клеток глиомы С6 в культуре. А – окраска антителами к белку p53. Ядра окрашены DAPI. Б – окраска антителами к GFAP. Ядра окрашены DAPI. В – контрольное окрашивание вторичными антителами Alexa 488, флуоресценция отсутствует. Ядра окрашены DAPI. Г – контрольное окрашивание вторичными антителами Alexa 633, флуоресценция отсутствует. Ядра окрашены DAPI.

протеомного и транскриптомного профиля, способностью к самообновлению, высокой репликативной активностью и мультипотентностью.

Результаты проведенного нами иммуноцитохимического исследования свидетельствуют, что характеристиками стволовых клеток обладает подавляющее большинство клеток глиомы С6. Очевидно, в процессе культивирования, после серии пассажей некоторая часть клеток глиомы С6 приобретает преимущественно нейрональный или глиальный иммунофенотип, что может быть вызвано влиянием специфических условий среды содержащей добавки в виде коктейля ростовых факторов. При этом, популяция сохраняет свою стратегическую характеристику – высокое число стволовых клеток, содержащих ключевые мутации.

Таким образом, опухолевые клетки глиомы линии С6 представляют собой нейральные стволовые клетки, содержащие мутации одного из ключевых регуляторов клеточного цикла – гена p53. При культивировании *in vitro* клетки глиомы С6 образуют три морфологических изотипа, что объясняется влиянием внешних факторов или воздействием внутренних механизмов.

3.3.3. Клинико-функциональная характеристика модели *in vivo*

Для подбора оптимального количества клеток для создания модели опухоли головного мозга, животные были разделены на три группы по количеству вводимых клеток. Крысам первой группы (N=15) было введено 2×10^5 клеток глиомы линии С6. Крысам второй группы (N=15) имплантировано 5×10^5 , а крысам третьей группы (N=15) 2×10^6 опухолевых клеток. В качестве контроля пяти животным в область каудопутамена было введено 10 мкл физраствора (NaCl).

Спустя 10 сут с момента имплантации опухолевых клеток, магнитно-резонансная томография выявила опухоли головного мозга у большинства крыс первой группы. Количество животных с опухолями мозга среди других

экспериментальных групп значительно различалось. Опухоли мозга были выявлены только у 60 % животных второй, и отсутствовали более чем у половины крыс третьей группы (рисунок 9).

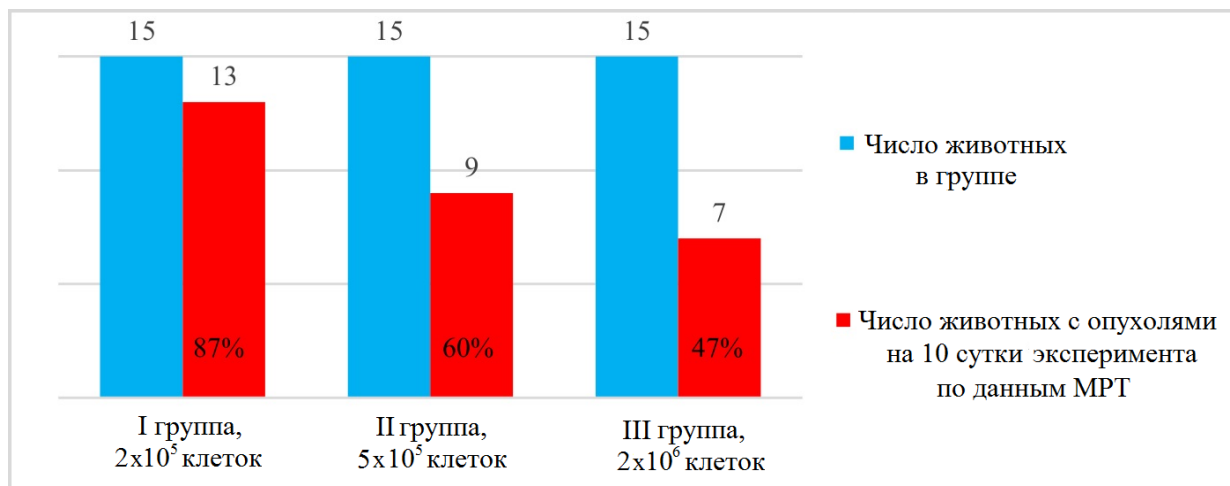


Рисунок 9 – Число крыс в трех группах, у которых развились опухоли через 10 сут с начала эксперимента.

Согласно данным МРТ, у большинства крыс первой группы на месте введения клеток глиомы визуализировалось объемное новообразование неправильной формы, неоднородной консистенции, окруженное зоной перифокального отека, с фокусными кровоизлияниями и признаками сдавления желудочков мозга (рисунок 10).

Животные первой группы были очень вялыми, не проявляли интереса к событиям, происходящим в клетке, отказывались от еды, неохотно пили. Попытка взять животное в руки или осторожное прикосновение к вибрисам сопровождалось пронзительным визгом. Неврологическая симптоматика нарастала быстро. Не грубые симптомы в виде птоза, тремора и гипертонуса конечностей сопровождалась дискоординацией движений между передними и задними лапами ослаблением хватательного рефлекса, нарушением слуха и равновесия, появлением манежных движений. Между второй и третьей неделями эксперимента у крыс первой группы появились нарушения мочеиспускания по центральному типу, что свидетельствовало о нарушении

привычных взаимоотношений между спинальными центрами и корой головного мозга.

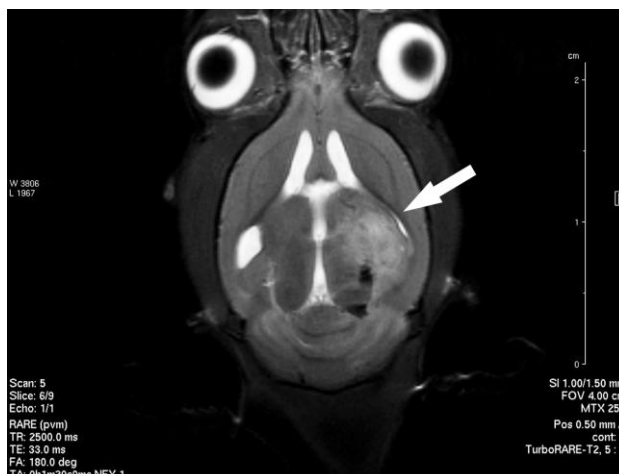


Рисунок 10 – Опухоль в головном мозге крысы первой группы спустя 10 сут с момента имплантации опухолевых клеток. Магнитно-резонансная томография, режим TurboRARE –T2, 5:1.

Углубление симптоматики сопровождалось развитием спастических параличей, выпадением на стороне опухоли роговичного рефлекса, появлением экзофтальма, развитием комы и дыхательных нарушений, что очевидно было вызвано сдавлением жизненно важных центров мозга, вторичным нарушением мозгового кровообращения и дислокационным синдромом.

Животные второй группы характеризовались меньшей тяжестью состояния, активно передвигались в пределах клетки, длительное время не обнаруживали серьезных неврологических нарушений. Грозные симптомы в виде нарушения рефлексов на равновесие и переворачивание, исчезновение роговичного рефлекса, появление на стороне опухоли экзофтальма, развитие парезов, параличей и тазовых нарушений происходили значительно позже, когда крысы первой группы уже были из эксперимента (рисунок 11).

Крысы третьей группы характеризовались высоким уровнем активности в течение первых трех недель эксперимента. Декомпенсация сопровождалась быстрым развитием неврологической симптоматики и гибелью животных. Восемь крыс третьей группы смогли преодолеть рубеж

выживаемости в шесть недель. При этом у пяти животных магнитно-резонансная томография и последующее морфологическое исследование не выявило опухолей в зоне введения клеток глиомы линии С6.

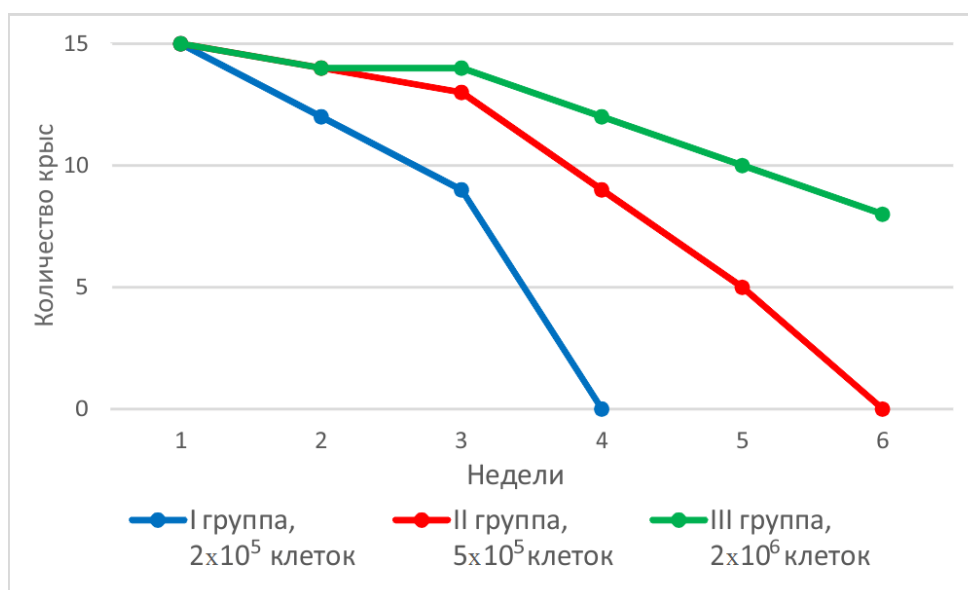


Рисунок 11 – Динамика смертности крыс с глиомой С6 в трех группах.

Высокий процент развития опухолей и показатели клинической картины неопластического процесса у животных первой группы наиболее полно соответствовали поставленным задачам.

3.3.4. Гистологическая и иммуногистохимическая характеристика модели *in vivo*

Морфологическое исследование, проведенное на 10 сут эксперимента, с применением стандартных методов окраски гематоксилин-эозином, выявило в месте имплантации опухолевых клеток очаг неправильной продолговатой формы с нерезкими контурами и участками инвазии в мозговую паренхиму. Зона неоплазии была представлена скоплением клеток с ядрами разнообразной формы и размера, полостями, содержащими дегенерирующие клетки с пикнотизированными ядрами, а также новообразованными кровеносными сосудами (рисунок 12А). Иммуногистохимическая окраска антителами к белку *iba-1*, маркеру

микроглиальных клеток, выявила преобладание активированной микроглии как в самой опухоли, так и в веществе мозга ниже места поражения (рисунок 12Б, В).

При этом число *iba-1*-позитивных микроглиоцитов в самой опухоли и прилежащих участках мозга существенно превосходило их количество в аналогичных областях противоположного полушария (рисунок 13).

Опухоль не окрашивалась антителами к глиальному фибриллярному кислому белку (рисунок 12Г). Но площадь окрашивания GFAP-позитивной глиии ниже опухолевого узла существенно превосходила аналогичные параметры противоположного полушария (рисунок 14).

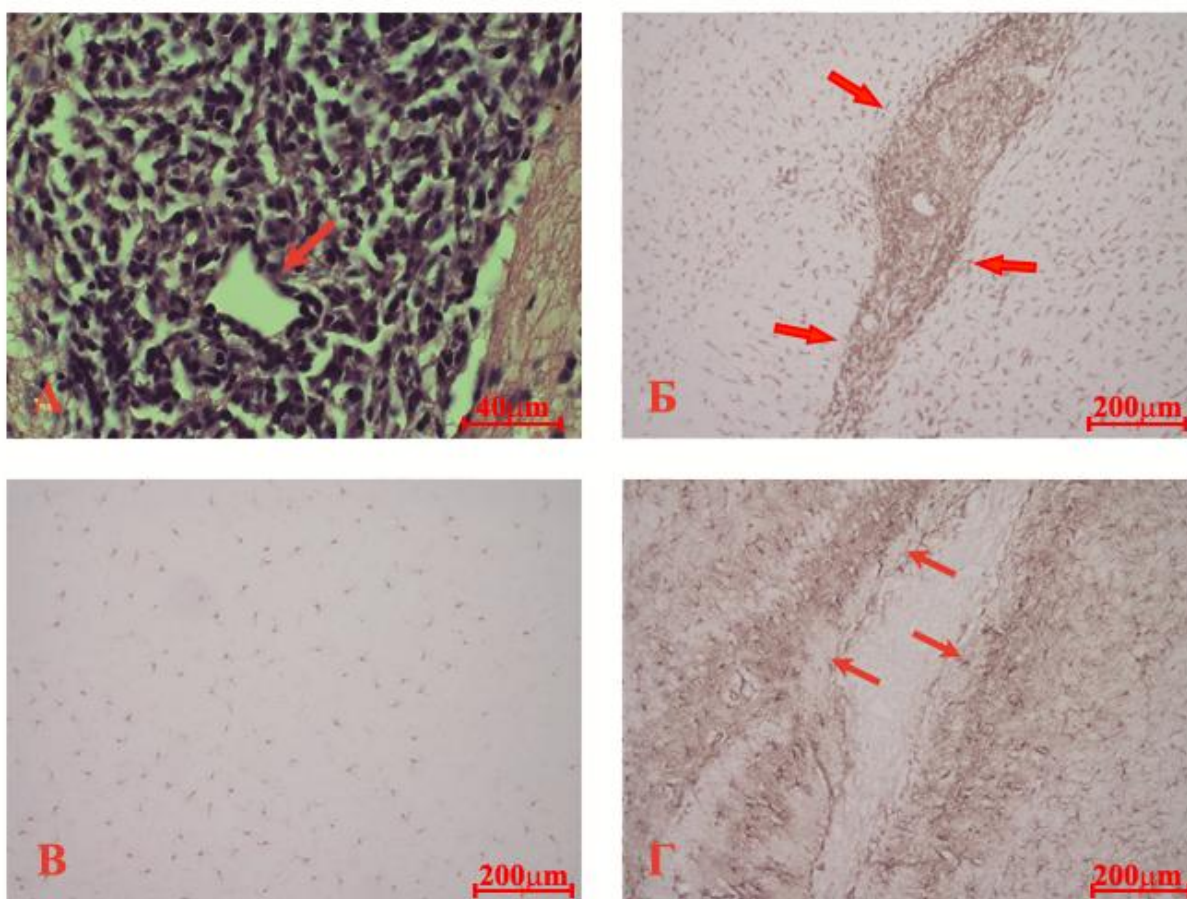


Рисунок 12 – Морфология опухолевого очага в мозге крыс спустя 10 сут с момента имплантации клеток глиомы С6. А – опухоль в мозге крысы с кровеносным сосудом (красная стрелка). Окраска гематоксилин-эозин. Б – иммуногистохимическое окрашивание опухолевого очага антителами к *iba-1*. В – клетки микроглии в веществе мозга противоположного опухоли полушария. Окраска антителами к *iba-1*. Г – кольцо реактивных астроцитов, окружающих опухолевый очаг. Окраска антителами к GFAP

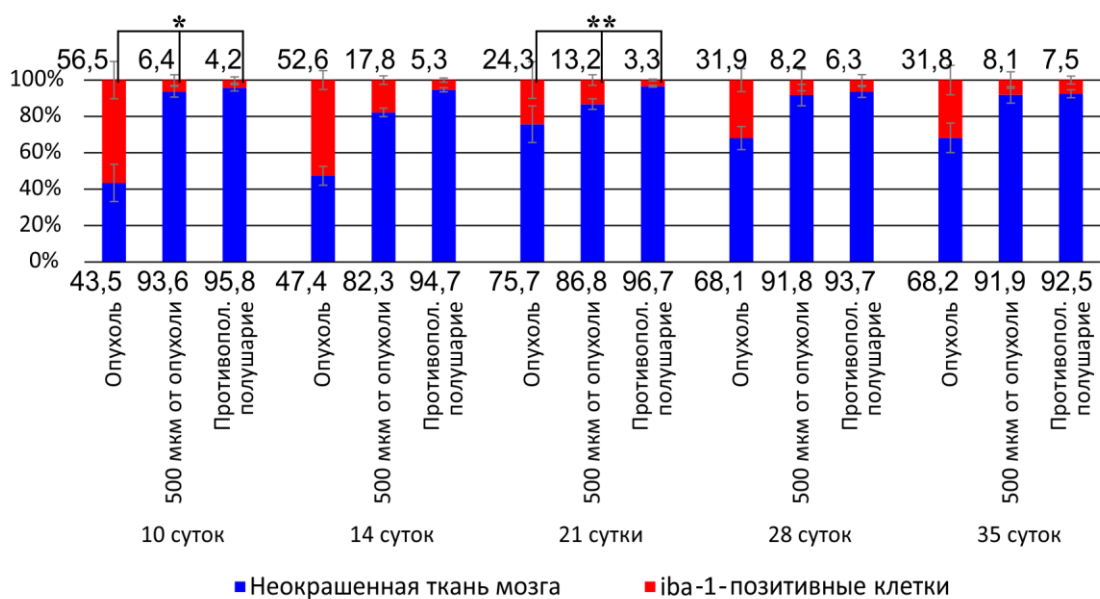


Рисунок 13 – Отношение площади Iba-1 позитивной микроглии к общей площади микропрепарата, $p < 0,05$.

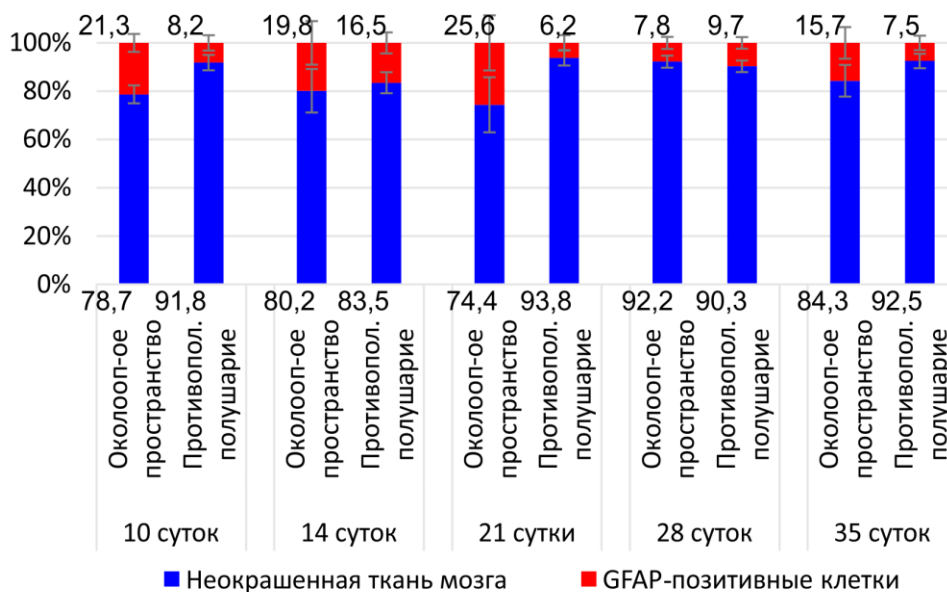


Рисунок 14 – Отношение площади GFAP позитивной глии к общей площади микропрепарата, $p < 0,05$.

Через 14 сут с момента имплантации клеток глиомы С6, опухолевый очаг в мозге крыс был представлен неопластической тканью с большим количеством новообразованных кровеносных сосудов. Опухолевые клетки, окружая кровеносные сосуды, формировали длинные тяжи, вторгающиеся турбулентными потоками в окружающую паренхиму мозга. Инвазивный рост

сопровождался инфильтрацией мозговой ткани опухолевыми клетками, которые группируясь, на некотором удалении от первичного узла создавали вторичные, сателлитные очаги и запускали процессы неопластического ангиогенеза (рисунок 15А). Окраска антителами к маркеру микроглиальных клеток – белку *iba-1* выявила преобладание микроглиоцитов непосредственно в опухолевом очаге и их повышенное накопление на стороне поражения в тканях, расположенных по близости с первичным очагом, что свидетельствовало об активном участии микроглиальных клеток в процессах инвазивного роста (рисунок 15Б).

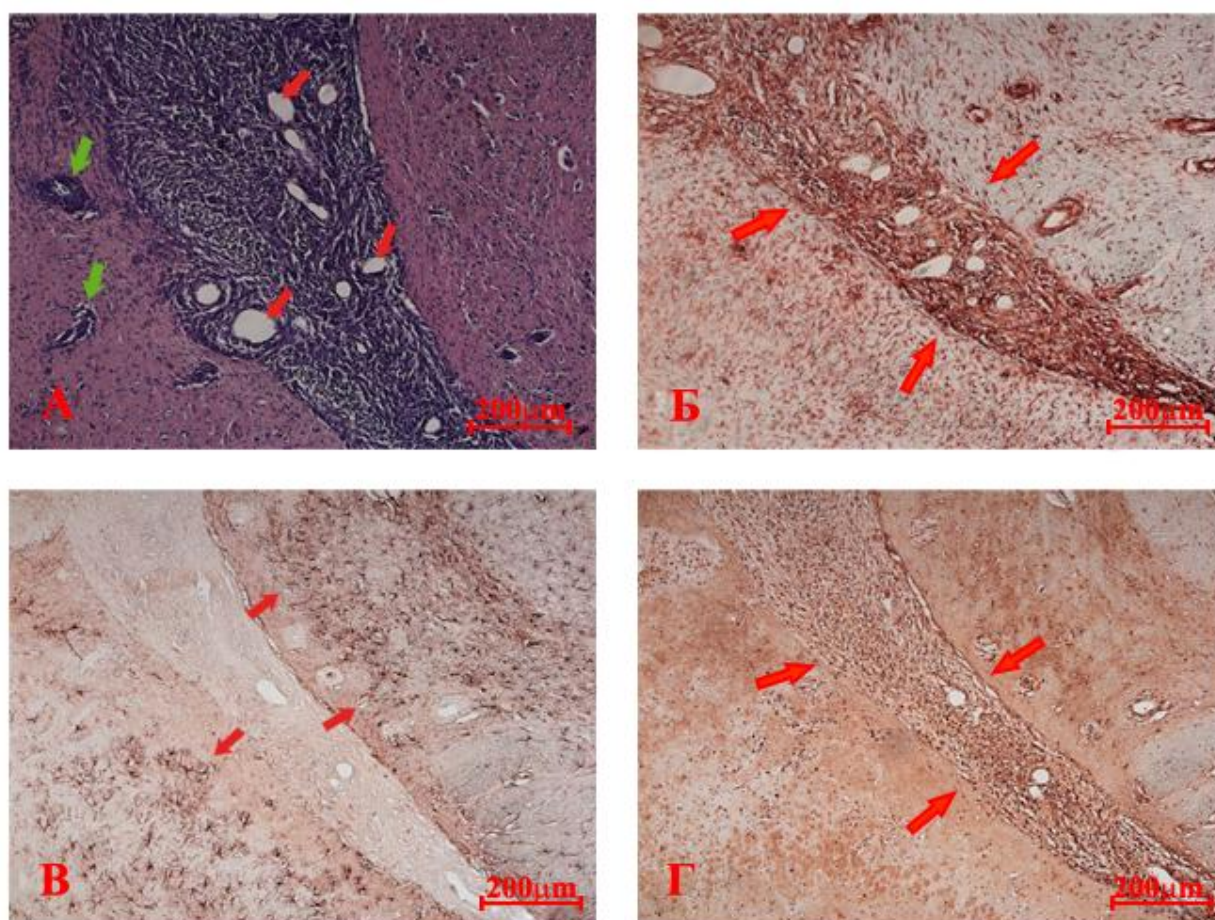


Рисунок 15 – Морфология опухолевого узла в мозге крыс, спустя 14 сут с момента имплантации клеток глиомы С6. А – опухолевый очаг с новообразованными кровеносными сосудами (красные стрелки) и вторичными сателлитными очагами (зеленые стрелки). Окраска гематоксилин-эозин. Б – иммуногистохимическое окрашивание опухолевого очага антителами к *iba-1*. В – кольцо реактивных астроцитов, окружающих опухолевый очаг. Окраска антителами к GFAP. Г – неопластический очаг в мозге. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к PCNA.

Микроглиальные клетки одни из первых реагируют на ишемическое повреждение нервной ткани, направленно мигрируют в зону повреждения из других отделов мозга и проникают в область поражения через кровеносные микрососуды, что объясняет их преобладание в зоне поражения (рисунок 13). Стимуляция клеточного ответа включает морфологические изменения, ключевым из которых является пролиферация микроглиоцитов, наряду с опухолевыми и эндотелиальными клетками, как в зоне неоплазии, так и прилегающих к ней участках мозга и кровеносных сосудах (рисунок 15Г).

К 14 суткам наблюдений ткань опухоли не окрашивалась антителами к глиальному фибриллярному кислому белку. GFAP-позитивные клетки, преимущественно звездчатой формы, содержали большое количество ветвистых отростков различной длины, располагались вдоль границ первичного узла и концентрировались в местах вторжения неопластической ткани в вещество мозга (рисунок 15В). Площадь окрашивания GFAP-позитивной глиии на стороне опухоли и тканях противоположного полушария существенно не отличалась (рисунок 14).

На 21 сут морфологическая картина опухолевого процесса меняется. Группировка неопластических клеток вокруг новообразованных кровеносных сосудов становится более плотной, однако тенденция к их миграции в окружающую паренхиму мозга становится более очевидной. Основную массу опухоли начинают занимать обширные зоны некроза (рисунок 16А). Количество iBa-1-позитивных микроглиальных клеток в опухолевой ткани уменьшается (рисунок 13), подобно опухолевым клеткам они окружают новообразованные кровеносные сосуды (рисунок 16Б) и упираются в зоны некроза. В опухоли только зоны некроза интенсивно окрашиваются антителами к GFAP, что свидетельствует о накоплении в этих областях глиального фибриллярного кислого белка (рисунок 16В, рисунок 14). Вероятно, удаляясь от кровеносных сосудов, опухолевые клетки приобретали астроцитарный фенотип и гибли, попадая в суровые условия

гипоксии. Очевидно, гипоксические зоны неоднородны по своему составу, и возможно, в их глубине есть живые клетки, поскольку опухоль равномерно окрашивается маркерами пролиферации (рисунок 16Г).

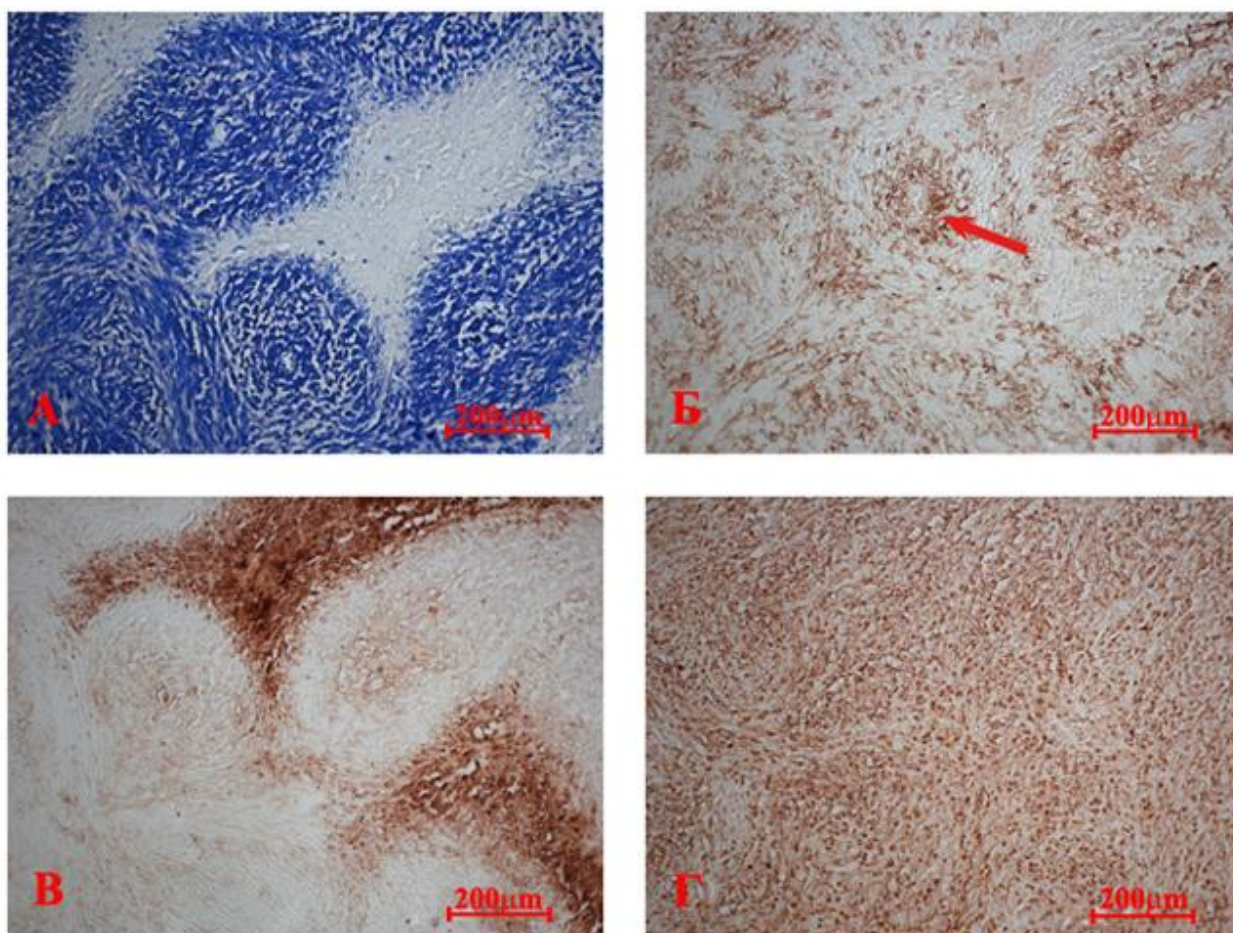


Рисунок 16 – Морфология опухолевого очага в мозге крысы, спустя 21 сут с момента имплантации клеток глиомы С6. А – опухоль в мозге крысы с обширными некрозами (светлые зоны). Окраска толуидиновый синий. Б – микроглиальные клетки, окружающие кровеносный сосуд (красная стрелка). Иммуногистохимическое окрашивание антителами к *Iba-1*. В – опухолевый очаг с обширными некрозами, окрашенными антителами к GFAP (темно-коричневые зоны). Г – активно делящиеся опухолевые клетки неопластического очага. Окраска антителами к PCNA.

Через 28 сут эксперимента опухоль достигала больших размеров, что сопровождалось выраженным отеком вещества головного мозга (рисунок 17).

При гистологическом исследовании выявилось неоднородное новообразование без четких границ с признаками инвазии в прилегающую мозговую паренхиму, с формированием множества вторичных сателлитных очагов и инфильтрацией прилегающих тканей опухолевыми клетками.

Опухолевая ткань содержала огромное количество новообразованных микрососудов со сгруппированными вокруг них опухолевыми клетками, которые граничили с обширными зонами некроза (рисунок 18А).



Рисунок 17 – Макропрепарат. Опухоль в головном мозге крысы, вызванная имплантацией клеток глиомы линии С6, 28 сут эксперимента.

При гистологическом исследовании выявилось неоднородное новообразование без четких границ с признаками инвазии в прилегающую мозговую паренхиму, с формированием множества вторичных сателлитных очагов и инфильтрацией прилегающих тканей опухолевыми клетками. Опухолевая ткань содержала огромное количество новообразованных микрососудов со сгруппированными вокруг них опухолевыми клетками, которые граничили с обширными зонами некроза (рисунок 18А).

Микроглиальные клетки группировались вокруг кровеносных сосудов и распределялись по опухоли, следуя вектору инвазии неопластических клеток в паренхиму мозга, их количество в неопластическом очаге и околоопухолевом пространстве существенно не изменилось (рисунок 18Б, рисунок 13). В опухолевой ткани появлялись единичные GFAP-позитивные клетки, расположенные на некотором удалении от кровеносных сосудов.

Активированные GFAP-позитивные глиоциты были отмечены в мозговой ткани непосредственно граничащей с опухолью (рисунок 18В, рисунок 14). Окраска антителами к белку PCNA свидетельствовала о высокой интенсивности пролиферативных процессов в области инвазии опухолевых клеток в паренхиму мозга (рисунок 18Г).

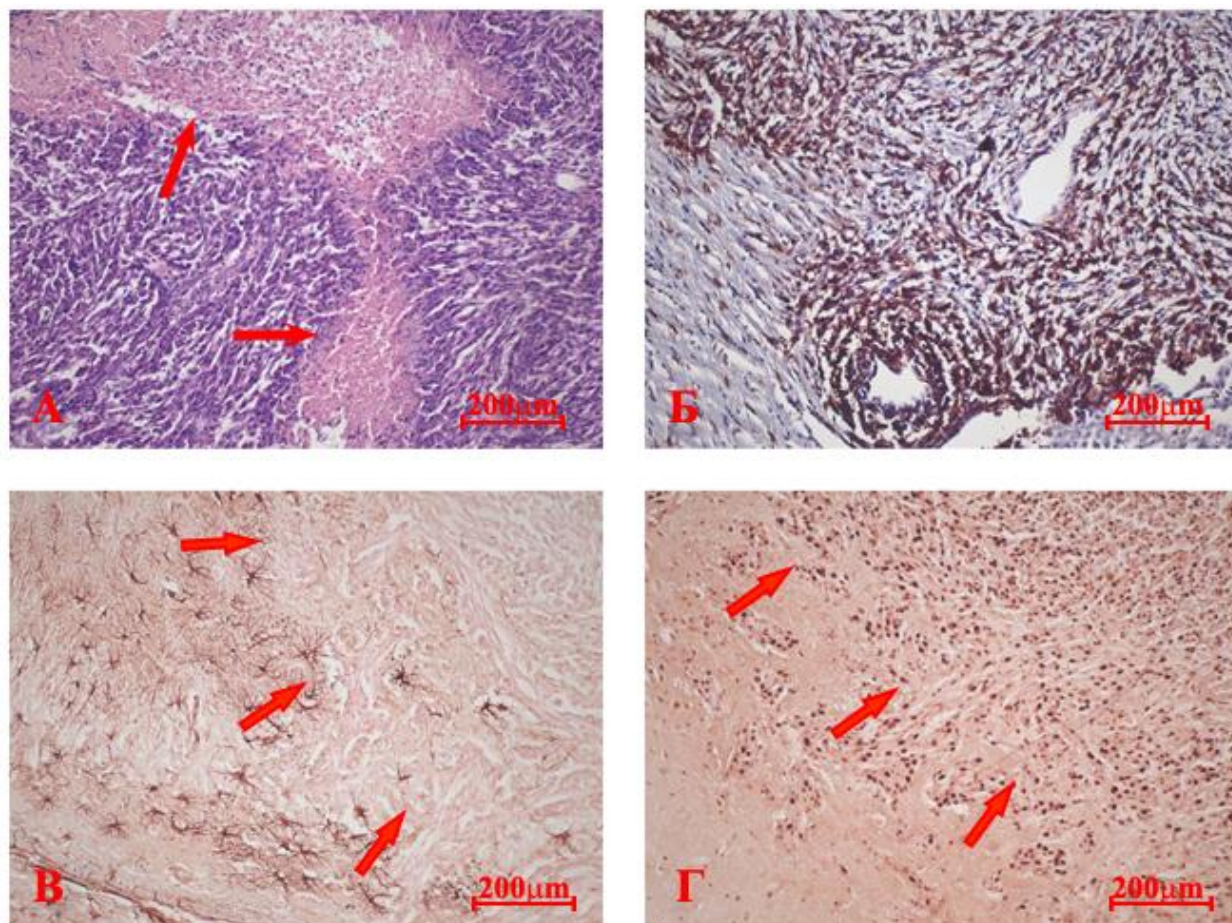


Рисунок 18 – Морфология опухолевого очага мозга крысы, спустя 28 сут с момента имплантации клеток глиомы С6. А – зона опухоли с обширными некрозами (красные стрелки). Окраска гематоксилин-эозин. Б – большое скопление микроглиоцитов вокруг кровеносных сосудов. Окраска антителами к *iba-1* + гематоксилин. В – клетки астроглиального ряда на границе с опухолью мозга крысы. Окраска антителами к GFAP. Г – пролиферирующие клетки на границе с опухолью мозга в зоне инвазии. Окраска антителами к PCNA.

Через 35 сут наблюдения неопластическая ткань содержала массивные зоны некроза, на фоне которых располагались островки опухолевых клеток, сгруппированных вокруг новообразованных кровеносных сосудов (рисунок 19 А).

Количество микроглии не изменилось, она окружала опухоль по периферии, следуя за неопластическими клетками, инфильтрирующими паренхиму мозга (рисунок 19Б, рисунок 13). В свою очередь, GFAP-позитивные глиоциты концентрировались вдоль границ опухолевого очага, очевидно амортизируя процессы неопластической инвазии, не вторгаясь в опухоль (рисунок 19В, рисунок 14). К этому времени происходило падение темпов пролиферации, но сохранялась пролиферация отдельных клеточных клонов (рисунок 19Г).

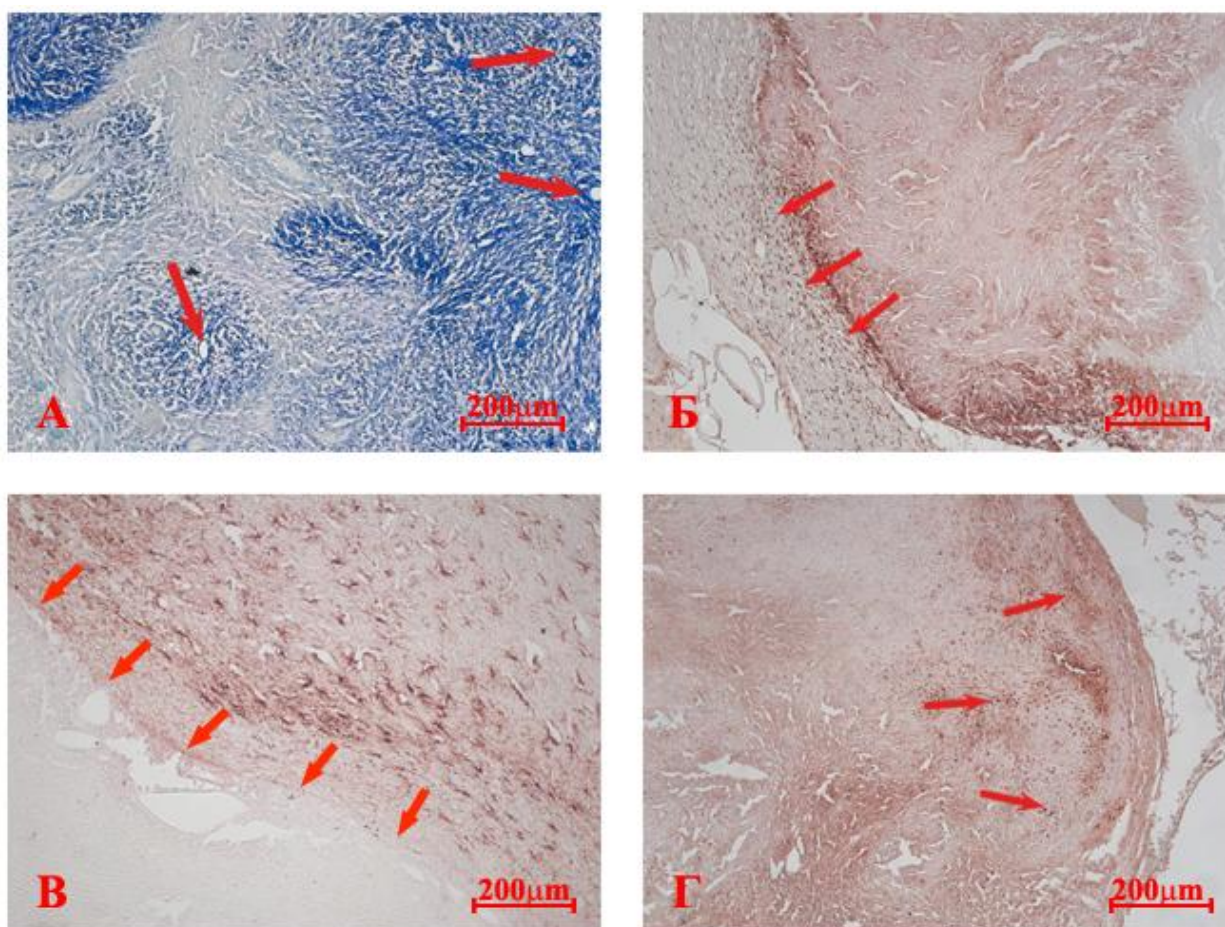


Рисунок 19 – Морфология опухолевого очага в мозге крыс через 35 сут с момента имплантации клеток глиомы С6. А – опухолевый очаг с кровеносными сосудами (красные стрелки) и обширными зонами некроза (светлые участки). Окраска гематоксилин-эозин. Б – микроглиоциты на границе опухоли в зоне инвазии. Окраска антителами к *iba-1*. В – клетки астроглиального ряда на границе опухоли. Окраска антителами к GFAP. Г – пролиферирующие клетки в зоне инвазии (красные стрелки). Окраска антителами к PCNA.

Таким образом, стереотаксическая имплантация 2×10^5 клеток глиомы в головной мозг крыс линии С6 в сжатые сроки воспроизводит сложный каскад межклеточных взаимодействий между ОСК и локальным микроокружением, ведущий к качественному изменению внутритканевой иерархии и позволяет получить экспериментальную модель глиобластомы человека. Нарастание тяжести неврологических нарушений от сравнительно легких неспецифических симптомов до грубых очаговых, проводниковых и общемозговых расстройств свидетельствует о естественном течении опухолевого процесса, вызванного появлением и функциональным доминированием в мозге критического числа ОСК. Морфологически опухоль характеризуется высокой агрессивностью, инвазивным ростом, клеточным полиморфизмом, интенсивной пролиферацией опухолевых клеток, ангиогенезом, быстрым формированием очагов некроза, выраженной реакцией астроцитарной глии окружающей неопластическую ткань. Клетки микроглии, интенсивно инфильтрирующие опухоль, концентрируются в зонах инвазивного роста, сопровождают миграцию опухолевых клеток в паренхиме мозга и являются проводником процессов инвазии.

3.4. Оценка эффективности гемопоэтических стволовых клеток до и после применения химиотерапии

3.4.1. Феномен направленной миграции ГСК к глиоме в головного мозга крыс.

В литературе имеется множество доказательств, что СК подавляют рост опухолей и вызывают гибель неопластических клеток, что и было доказано в нашем эксперименте *in vitro*. С практической точки зрения, этот эффект должен наблюдаться *in vivo*, что позволит провести определенные параллели с клиникой.

В нашей работе использованы лабораторные крысы породы Вистар, которым под кратковременным наркозом, вызванным ингаляцией препарата

Севоран (Abbott Laboratories), вводили ГСК, окрашенные клеточным трейсером CFDA SE в хвостовую вену в количестве 4×10^5 в 400 мкл физиологического раствора со скоростью 10 мкл в секунду на 10 сут после стереотаксической имплантации глиомы С6 в головной мозг животных.

Неврологическое тестирование по методу Тупера и Валаса (Tupper, Wallace, 1980) (таблица 1) показало отличие состояния контрольных животных по сравнению с группой С6+ГСК и группой С6 (рисунок 20), что можно объяснить наличием опухолей в головном мозге экспериментальных животных, вследствие сдавливания тканей мозга опухолью. Важно отметить, что показатели неврологического статуса группы С6+ГСК лучше, чем у группы животных с опухолью.

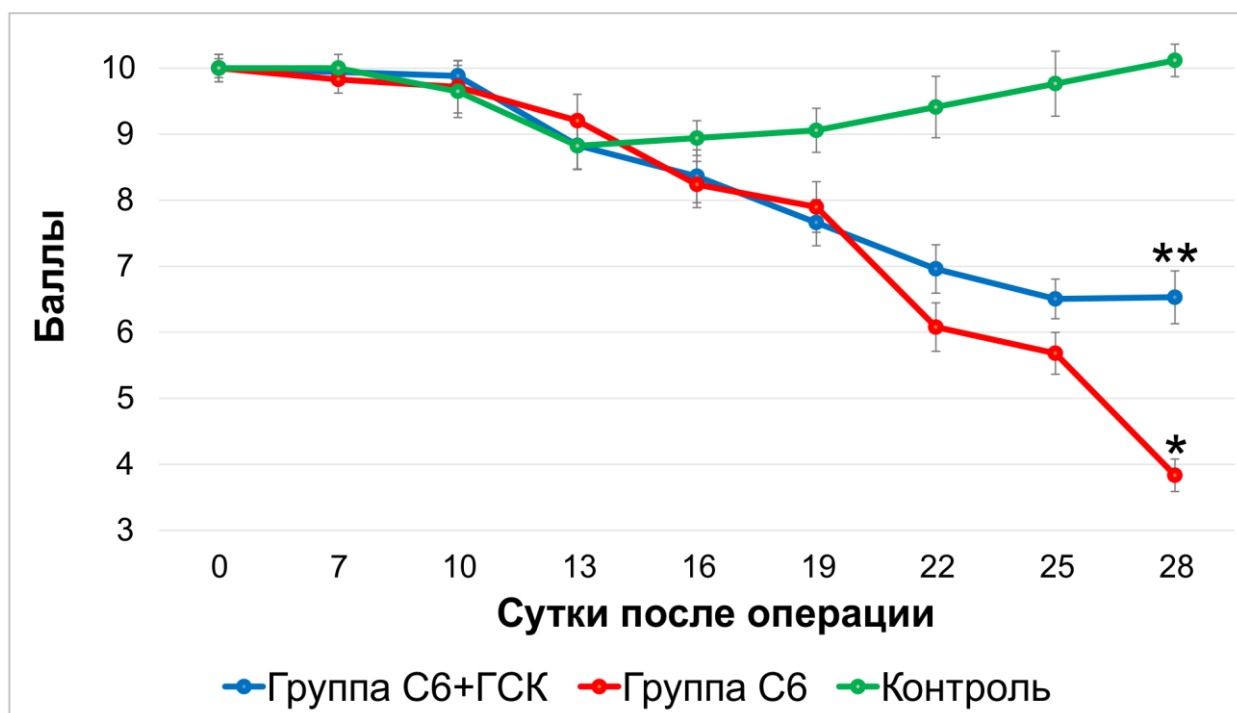


Рисунок 20 – Неврологический статус крыс после имплантации глиомы С6 в головной мозг. Указаны планки стандартного отклонения.

В отличие от контроля, животные из группы С6 к 10 сут эксперимента становились вялыми, отказывались от еды, неохотно пили. Неврологическая симптоматика нарастала быстро. Симптомы в виде птоза, тремора и не глубоких парезов конечностей сменялись параличами, сопровождаемыми появлением на стороне опухоли экзофтальма, с последующим развитием

комы и дыхательных нарушений, что, очевидно, было обусловлено дислокационным синдромом. Большая часть крыс группы С6+ГСК длительно не обнаруживала грубых признаков поражения ЦНС. Крысы длительное время оставались более активными по сравнению с группой С6 и контролем, охотно ели. В свою очередь, часть крыс этой группы после введения ГСК, обнаруживала снижение роговичного рефлекса, наличие птоза, нарастания экзофтальма на стороне опухоли, снижения сгибательных и хватательных рефлексов, увеличения времени реакции на световые и звуковые раздражители. Однако продолжительность их жизни была больше, чем в группе С6 (рисунок 21).

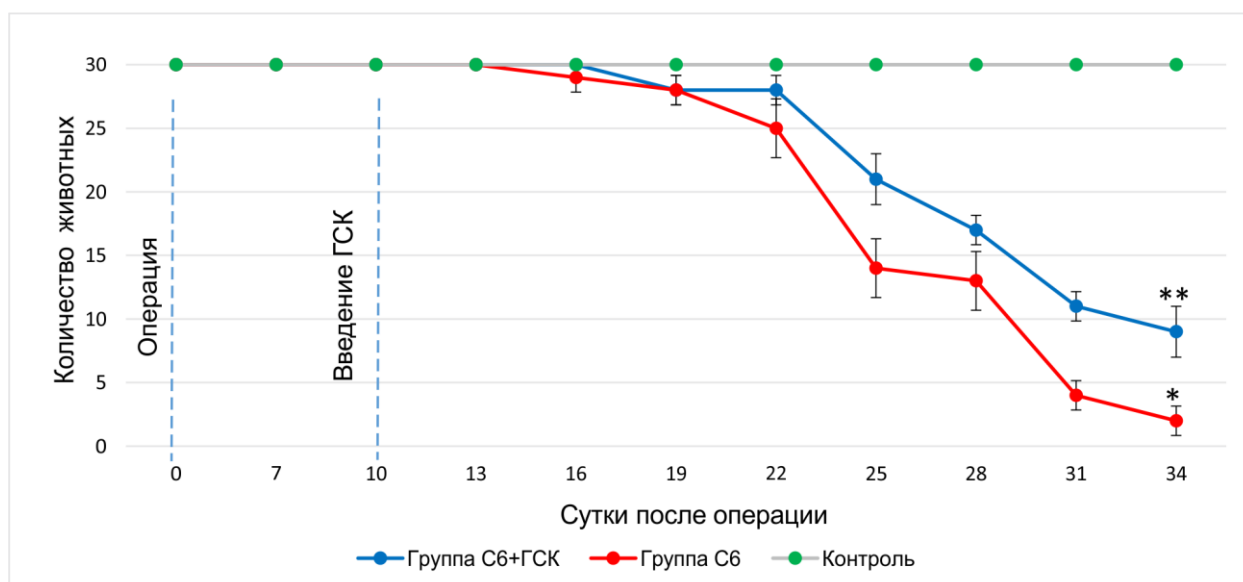


Рисунок 21 – Выживаемость крыс в эксперименте после имплантации глиомы С6 в головной мозг.

Морфологическое исследование проводили на 3, 5 и 7 сут после введения ГСК. На 3 и 5 сут после введения ГСК в хвостовую вену крысам, на гистологических срезах визуализировали ГСК в сосудах головного мозга, окрашенные клеточным трэйсером CFDA SE (рисунок 22А, Б).

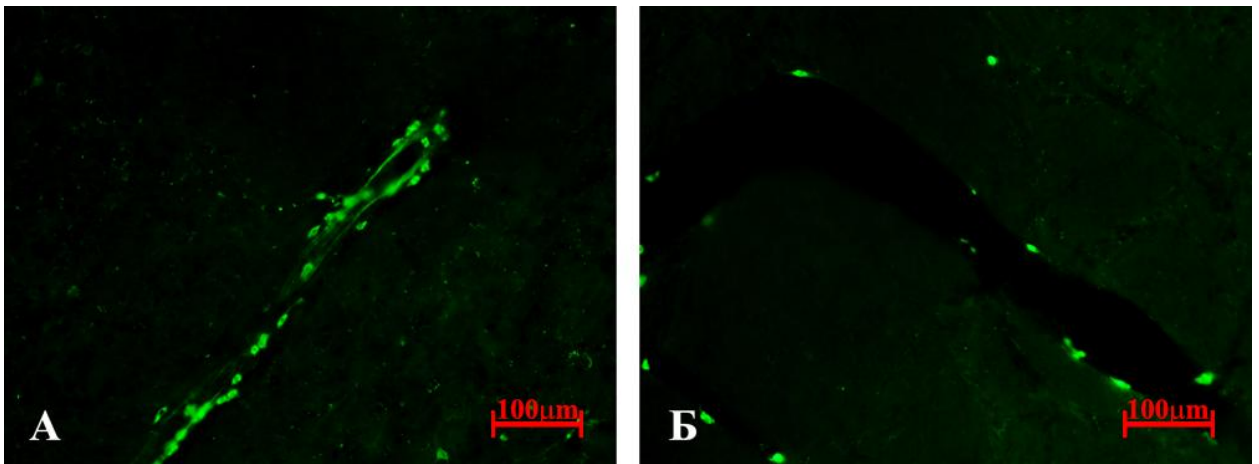


Рисунок 22 – Миграция в головной мозг крыс ГСК, меченных CFDA SE и введенных в хвостовую вену. А – ГСК в сосуде головного мозга крысы в полушарии с опухолью на 3 сут после введения. Б – ГСК в сосуде головного мозга крысы в полушарии с опухолью на 5 сут после введения.

На гистологических срезах было обнаружено, что на 5 сут ГСК мигрируют к неопластическому очагу, скапливаясь вокруг зоны опухоли (рисунок 23А). Единичные клетки проникают в опухоль (рисунок 23Б). На 7 сут миграция ГСК становится все более очевидной, клетки формируют вал вокруг опухоли (рисунок 23В), также мы наблюдали скопление ГСК в зонах некроза (рисунок 23Г).

Таким образом, миграция СК в область неопластического повреждения представляет собой многоуровневый регуляторный механизм. В ответ на повреждение СК выходят из своих ниш и мигрируют в патологический очаг, где модулируют процесса апоптоза, пролиферации или дифференцировки. В нашем эксперименте ГСК, введенные в системный кровоток, мигрировали к опухоли, проникали в неопластическую ткань и накапливались в зонах максимально выраженной гипоксии. Трансплантация ГСК улучшала функциональный статус экспериментальных крыс и увеличивала продолжительность жизни животных. Эти аргументы позволяют рассматривать индуцированную гипоксией миграцию СК в опухолевый очаг как стратегически важный клеточный механизм противоопухолевой защиты.

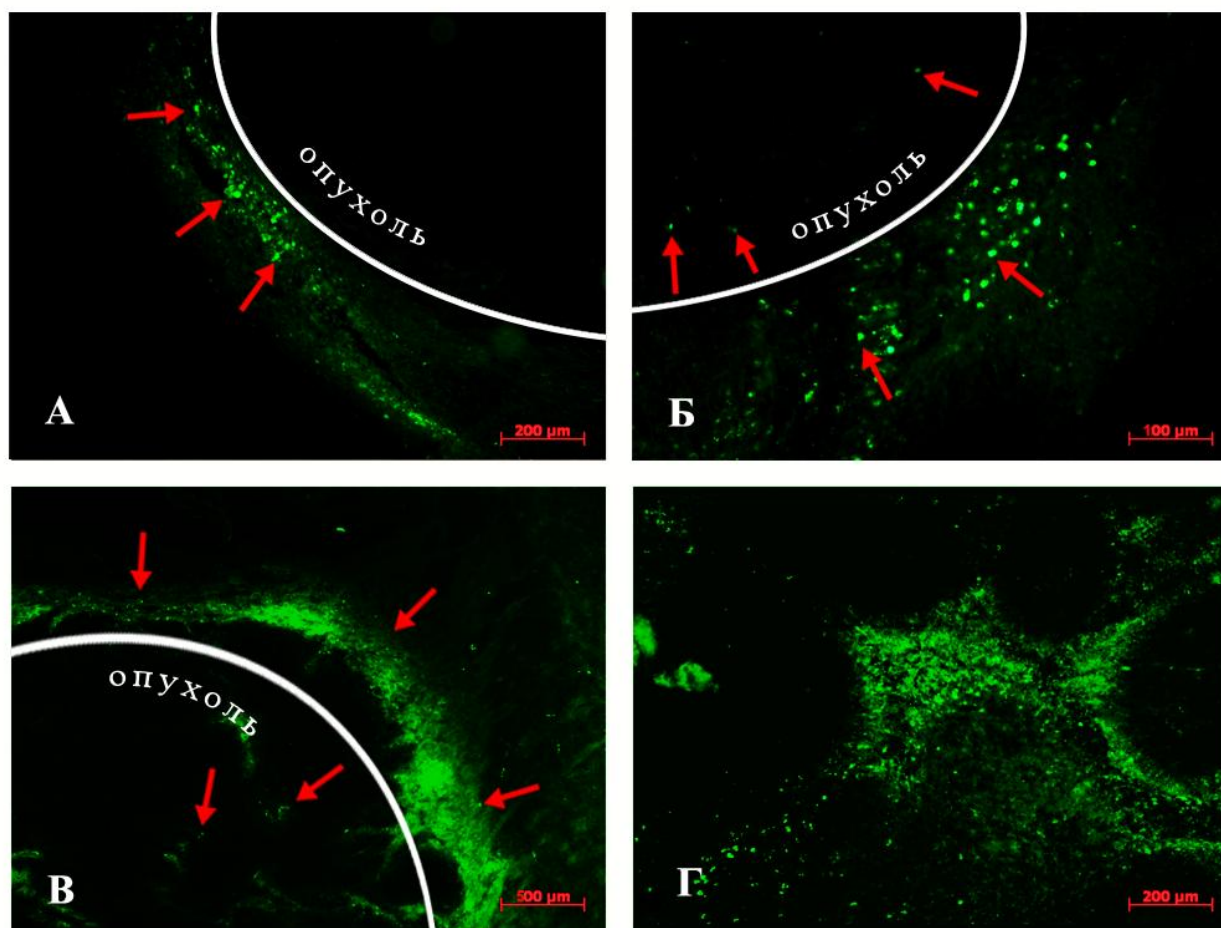


Рисунок 23 – Гистология головного мозга крыс. Миграция ГСК, окрашенных красителем CFDA SE, к опухолевому очагу. А – миграция ГСК к зоне опухоли на 5 сут после введения. Конфокальная сканирующая микроскопия. Б – скопление ГСК вокруг опухоли, единичные клетки проникают непосредственно в неопластический очаг. 5 сут после введения ГСК. Конфокальная сканирующая микроскопия. В – формирование вала ГСК вокруг опухоли в головном мозге на 7 сут после введения ГСК. Конфокальная сканирующая микроскопия. Г – скопление ГСК в зоне некроза на 7 сут после введения ГСК. Конфокальная сканирующая микроскопия.

3.4.2. Оценка эффективности гемопоэтических стволовых клеток при введении в организм животных с глиомой С6 после системного применения химиотерапевтического препарата темозоломид

Конвенционным подходом к лечению глиальных опухолей является хирургическая операция с последующим облучением и химиотерапией. Золотым стандартом химиотерапии инвазивных глиом является Темозоломид. Животные групп «Темозоломид» и «Темозоломид+клетки»

получали перорально химиопрепарат в дозе 50мг/кг массы тела с 10 по 14 сут эксперимента.

Группа «Контроль». Средняя продолжительность жизни животных контрольной группы составила $27,23 \pm 5,82$ сут с момента операции. Животные быстро теряли массу тела (рисунок 24), были вялыми, не проявляли интереса к событиям, происходящим в клетке, отказывались от еды, неохотно пили. Наблюдалась быстро нарастающая неврологическая симптоматика. Симптомы в виде птоза, тремора и не глубоких парезов конечностей быстро сменялись параличами, сопровождаемыми появлением на стороне опухоли экзофтальма, с последующим развитием комы и дыхательных нарушений, что, очевидно, было следствием компрессии мозга опухолью.

Группа «Темозоломид». Средняя продолжительность жизни животных группы «Темозоломид» составила $46,2 \pm 3,6$ сут с момента начала эксперимента. Животные этой группы не обнаруживали достоверных различий в показателях массы тела (рисунок 24), по сравнению с контролем, неохотно принимали пищу и были вялыми. Общее состояние животных было менее тяжёлым, характеризовалось большей стабильностью и менее резким развитием тяжелых неврологических нарушений. Мозговая симптоматика проявлялась в виде двустороннего полуптоза, негрубых спастических парезов конечностей, в сочетании с судорожными подергиваниями в лапках. Заторможенность сменялась эпизодами возбуждения в виде манежных движений в пределах клетки, что свидетельствовало о поражении одного из полушарий.

Группа «Темозоломид+клетки». Продолжительность жизни животных, получивших химиотерапию с последующим введением гемопоэтических стволовых клеток, составила $62,8 \pm 4,85$ сут, что ($p < 0,05$) выше подобного показателя в контроле (рисунок 25).

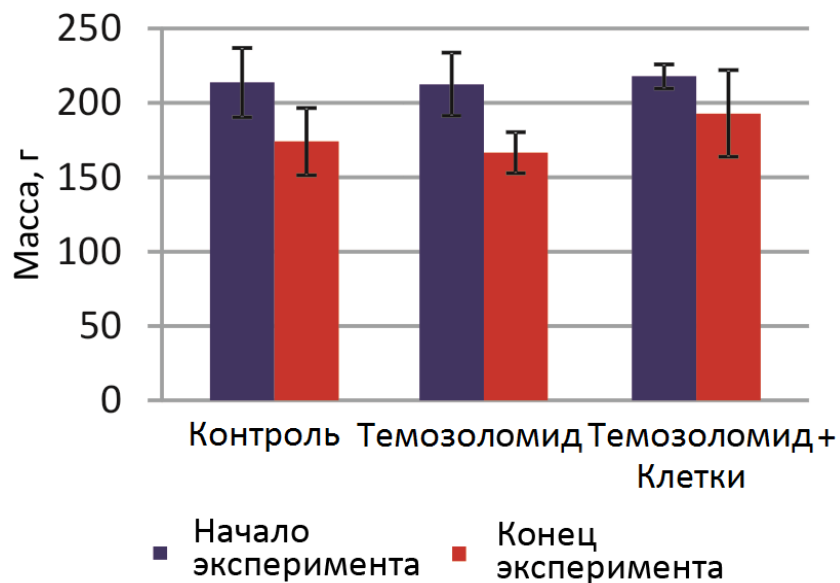


Рисунок 24 – Динамика массы тела животных в ходе эксперимента.

Имплантированные клетки визуализировались как в области опухоли, так и на некотором расстоянии от нее. Клетки имели шаровидную форму и не образовывали отростков. Очевидно, в процессе роста глиомы они мигрировали вслед за неопластическими клетками в паренхиму мозга, и, возможно, взаимодействовали с ними. Через 30 сут исследования воздействие лазера ($\lambda=488$ нм) не вызывало флуоресценции трансплантированных клеток, что, возможно, связано с их гибелью, дифференцировкой или вовлечением в опухолевый процесс. Животные незначительно теряли массу тела, длительно сохраняли активность и не отказывались от еды (рисунок 24). Неврологическое исследование длительное время не выявляло грубых нарушений мозговых функций. Животные длительное время оставались активными, охотно перемещались в пределах клетки, интересовались событиями за ее пределами. Тяжелые неврологические нарушения нарастали быстро с появления экзофтальма на стороне опухоли с последующим резким развитием комы и витальных расстройств.

Объем опухоли у экспериментальных животных существенно отличался (рисунок 26). Наименьшее значение объема глиомы выявлено у

крыс, группы «Темозоломид» $115,76 \pm 9,25 \text{ мм}^3$ и «Темозоломид+клетки» $114,74 \pm 5,54 \text{ мм}^3$. Эти значения достоверно ($p < 0,05$) меньше размеров опухоли в контрольной группе $202,09 \pm 39,72 \text{ мм}^3$.

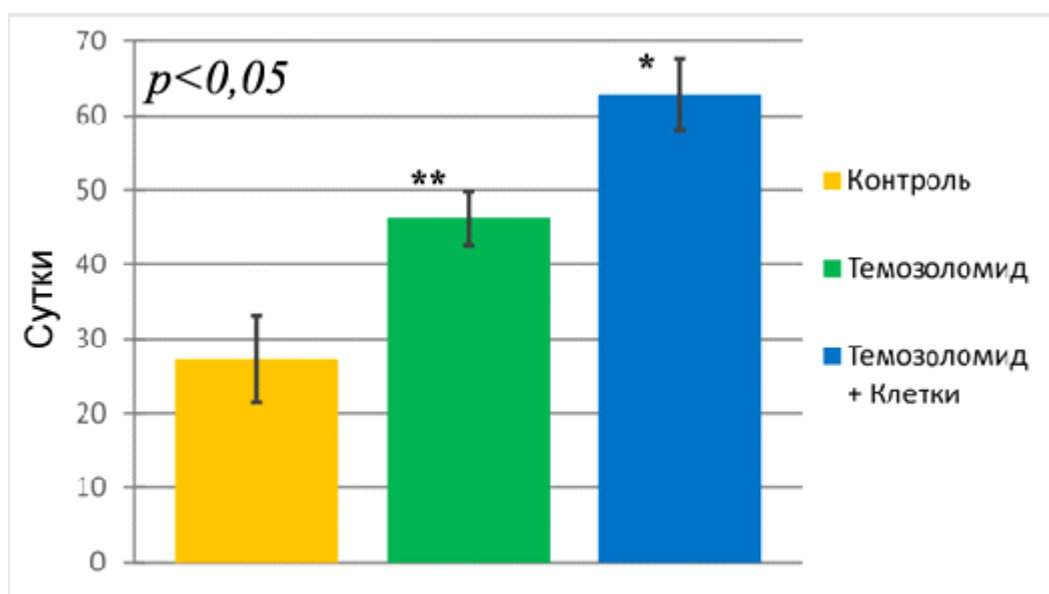


Рисунок 25 – Выживаемость крыс в ходе эксперимента.

Обращает внимание, что достоверно высокий показатель выживаемости у крыс группы «Темозоломид+клетки» сочетался с минимальным объемом опухоли, при этом наименьшее значение размера опухолевого узла у животных группы «Темозоломид» не сочетались с достоверным увеличением продолжительности жизни крыс этой группы.

Репаративно-регенеративные возможности СК используются опухолью, чтобы быстрее сформировать собственную сосудистую, лимфатическую и нейральную сети, оптимизировать тканевой метаболизм и усилить процессы роста и инвазии. Напротив использование ГСК после курса химиотерапии, очевидно, снижает потенциал рекрутирующих опухолевых клеток.

Способность СК к продукции фактора роста нервов, артемина, нетрина, мозгового нейротрофического фактора и фактора роста эндотелия кровеносных сосудов неоднократно доказанна. Нейротрофическое действие составляет основу терапевтического эффекта при трансплантации СК

больным с травмами и демиелинизирующими заболеваниями центральной нервной системы.

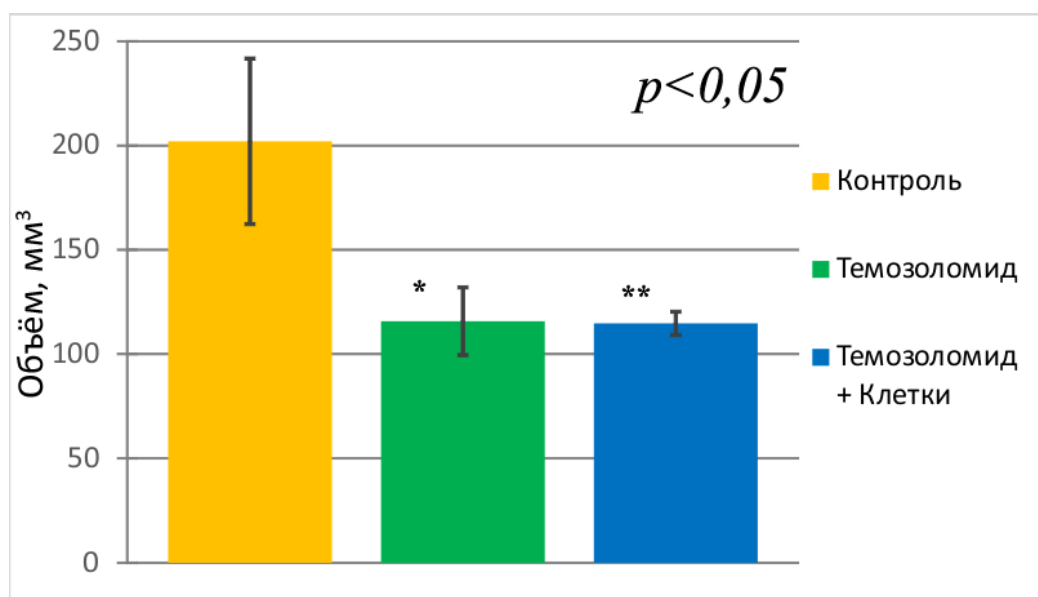


Рисунок 26 – Объем опухолевого узла в мозге экспериментальных животных, мм³.

В свою очередь, увеличение продолжительности жизни животных группы «Темозоломид+клетки» по сравнению с крысами, получившими только химиотерапию, следует объяснить отчетливым противоопухолевым действием трансплантата. Очевидно, активный протеомный обмен между стволовыми и опухолевыми клетками стимулирует воспалительную реакцию, активацию внутриклеточных путей сигнальной трансдукции Akt и Wnt, индуцирует арест клеточного цикла неопластических клеток в фазе G1 или запускает иные регуляторные механизмы, которые принципиально меняют ключевые параметры опухолевого процесса (таблица 5).

Взаимодействие стволовых и опухолевых клеток в головном мозге крыс представляется комплексным и сложным. Трансплантация препарата СК принципиально не улучшает показателей выживаемости и не меняет ключевых характеристик неопластического процесса, что, очевидно, является результатом функционального доминирования опухолевых клеток.

Таблица 5 – Параметры опухолевого процесса через 21 сут

	Площадь кровеносных сосудов, %	Площадь зон некроза, %
Контрольная группа	4,52 ±0,9	2,6±0,4
Группа «Темозоломид»	0,09±0,02	28,95±5,79
Группа «Темозоломид + клетки»	0,16±0,09	24,8±4,6

Примечание: Различия достоверны при $p < 0,05$

Применение темозоломида приводит к радикальному уменьшению объема опухоли. Введение препарата СК после курса химиотерапии достоверно ($p < 0,05$) увеличивает продолжительность жизни животных, по сравнению с группой, получавших только темозоломид. Таким образом, выживаемость, как главный критерий эффективности терапии в онкологии, с использованием клеточной трансплантации достоверно увеличивается. Идентификация механизмов этого явления и разработка более тонких методов и деликатных технологий управления процессами клеточной индукции входит в число приоритетных задач ближайшего будущего.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Антипролиферативный потенциал гемопоэтических стволовых клеток на модели глиомы линии С6 *in vitro*

Широкое изучение миграции стволовых клеток и их противоопухолевого потенциала началось с работы Карэн Эбоди (Aboody et al., 2000), где ученые показали миграцию НСК к глиоме и их распределение в опухоли. Впоследствии было проведено много работ по исследованию миграции и противоопухолевого эффекта стволовых клеток на НСК (Kosztowski et al., 2009; Donghong et al., 2012; Hua et al., 2013). Но использование НСК сопряжено с высокой степенью риска для пациентов, ввиду подверженности данного типа клеток к опухолевой трансформации и невозможности получения аутологических НСК. По причине данных обстоятельств, все больший интерес вызывают ГСК и ММСК (Houthuijzen et al., 2012; Sahin, Buitenhuis, 2012), поскольку их получение является отработанным и практически безопасным (Penforis, Pochampally, 2011). Данные нашей работы подтверждают данные литературы о том, что СК имеют антипролиферативный потенциал. Мы установили, что ГСК человека взаимодействуют с клетками крысиной глиомы С6 при совместном культивировании, что приводит к торможению пролиферации опухолевых клеток. Ингибирующее действие на пролиферацию клеток глиомы становится более очевидным по мере увеличения численности ГСК, причем мы не наблюдали эффекта подавления пролиферации опухолевых клеток при культивировании глиомы С6 с фибробластами крысы. Весьма вероятно, что механизм ингибирующего воздействия НСК может объяснить преобладание глиальных опухолей во второй половине жизни человека, когда интенсивность нейрогенеза в зрелом мозге существенно ослабевает, интенсивно пролиферирующие нейральные стволовые клетки накапливают мутации, что снижает качество их регуляторного сигнала (Conover, Shook,

2011; Franco et al., 2015). Так, в работах других ученых было показано, что НСК, введенные в мозг крыс с моделированной глиомой, ингибировали сигнальный каскад Ras / Raf / МЭК / Ерк и запускали апоптоз в опухолевых клетках (Hua et al., 2013). НСК и ММСК обладают большим потенциалом для лечения опухолей головного мозга. Зарубежные исследователи установили, что неизмененные НСК имеют естественную способность подавлять рост опухоли (Kosztowski et al., 2009).

Однако в литературе описаны и антагонистические эффекты, которые оказывают нейральные и гемопоэтические стволовые клетки на пролиферацию клеток глиомы (Sanai et al, 2005; Behnan et al., 2014). Наиболее изученными механизмами противоопухолевого действия здоровых стволовых клеток является направленная миграция в опухолевый очаг, усиление локальной воспалительной реакции, арест клеточного цикла неопластических клеток в фазе G₀/G₁ и активизация рецепторов семейства фактора некроза опухолей (TNF), а также эффект соседства «bystander effect» (Aboody et al., 2000; Benedetti et al., 2000; Kosztowski et al., 2009; Kim et al., 2010; Donghong et al., 2012; Hua et al., 2013).

Стратегической функцией СК в патологическом очаге является запуск программ регенерации, репарации и дифференцировки, а также возвращение поврежденных клеток в состояние устойчивого равновесия (Burgess et al., 2014). Существует мнение, что узловой точкой этого процесса является процесс межклеточного взаимодействия, описанного научной группой Карен Эбоди как «эффект молекулярной адгезии» (Aboody et al., 2000; Bjerkvig et al., 2005; Frank et al., 2010). Суть феномена состоит в том, что СК «прилипают» к метастазирующим клеткам опухоли и повсеместно их сопровождают «оседлав, подобно наезднику».

Результатом взаимодействия СК и ОСК может быть торможение неопластической пролиферации, вовлечение СК в онкологический процесс как модулятора пролиферации, инвазии, ангиогенеза и источника клеточных клонов, устойчивых к облучению и химиотерапии (Duesberg et al., 2000; Vi et

al., 2007; Kosztowski et al., 2009; Vinogradov, Wei, 2012), поэтому изучение механизмов взаимодействия СК и ОСК представляет собой важный научный аспект в клеточной биологии и медицине и открывает перспективы для создания новых подходов для лечения опухолей ЦНС, в частности глиобластомы.

4.2. Особенности антипролиферативного эффекта гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы С6 *in vitro*

Обмен клеточными белками в результате межклеточного взаимодействия ОК и СК следует считать крайне значимым молекулярным механизмом канцерогенеза. Немаловажным аргументом в пользу первичного начала процессов канцерогенеза НСК является именно трансформация протеома этих клеток, которая обуславливает его существенное сходство с протеомным профилем ОСК глиобластомы (Брюховецкий и др., 2013). Далее следует активный обмен белками, микроРНК и регуляторными генами в пределах ниши стволовой клетки, основу которого составляет эффект слияния клеток.

В нашем исследовании, начиная с 24 ч совместного культивирования, клетки глиомы С6 содержали включения трейсера RED CMTPX либо CFDA SE (в зависимости от этапа эксперимента), который изначально содержался в ГСК. Данные флуоресцентные красители прочно связываются с клеточными белками, после попадания в клетку и флуоресцирует после взаимодействия с внутриклеточными эстеразами. Переход красителя можно объяснить формированием структурного и функционального синцития между взаимодействующими клетками. Кроме того, мы обнаружили, что активный обмен красителем между ОК и ГСК происходит на 24 ч – 48 ч культивирования. Интересен тот факт, что к 96-120 ч количество ГСК уменьшается, почти до полного исчезновения, а клетки глиомы содержат флуоресцентный маркер от ГСК. Мы также не отрицаем о возможности слияния стволовых и неопластических клеток, что показано в работах

зарубежных исследователей (Pedrazzoli et al., 2011; Dittmar et al., 2012; Lazova et al., 2013). Наши данные соответствуют данным литературы. Например, ученые провели генотипирование метастазирующей меланомы в головной мозг, которая возникла после аллогенной трансплантации костного мозга донора (Lazova et al., 2013). По результатам генотипирования было показано, что аллели клеток донора, так же как и аллели клеток самого пациента, были обнаружены в геноме опухолевых клетках пациента. Количество аллелей в клетках опухоли было неодинаково, что указывает на то, что новообразование было инициировано случайным слиянием клеток донора и собственных клеток пациента (Lazova et al., 2013). Слияние и трансдифференцировка представляют собой естественный процесс для перехода в дифференцированные соматические клетки (Weissman et al., 2001).

В одной из теорий происхождения ОСК описано то, что трансдифференцировка здоровых клеток в ОСК происходит благодаря клеточному слиянию между здоровыми и неопластическими клетками в процессе их взаимодействия (Mimeault, Vatra, 2009; Torsvik et al., 2012). Возможно, узловым моментом перехода СК в ОСК является обмен цитоплазматическими белками – продуктами экспрессии онкогенов или мРНК, способными инактивировать гены-онкосупрессоры (Batista et al., 2012; Stoll et al., 2013). Мутационный процесс – движущая сила канцерогенеза и СК, активно пролиферирующие на протяжении всей жизни индивида, характеризуются наибольшей нестабильностью среди всех клеток организма и представляют собой идеальный объект для воздействия канцерогенов (Peterson et al., 2008; Lathia et al., 2011; Qiao et al., 2013). На сегодняшний день идентифицированы основные гены p53, PTEN, VHL, NF1, NF2, IDI1, CTNNB1, нарушение которых ведет к запуску неопластических процессов, первым этапом которого становятся модификации протеомного профиля (Jin et al., 2000; Wang et al., 2009; Gregorian et al., 2009).

В результате, активный обмен дефектными белками при взаимодействии клеток либо в результате процесса их слияния ведет к грубым нарушениям метилирования ДНК и другим эпигенетическим нарушениям, резко дестабилизирующим геном и стимулирующим экспрессию онкогенов (Lu, Kang, 2011; Dittmar et al., 2012). Описанный феномен представляет собой один из важных механизмов саногенетического взаимодействия ГСК и опухолевых клеток.

4.3. Характеристика экспериментальной модели мультиформной глиобластомы *in vitro* и *in vivo*

4.3.1. Морфологическая и иммуноцитохимическая характеристика модели *in vitro*

Как и большинство опухолевых линий, используемых в экспериментальной нейроонкологии, глиома линии С6 получена путем химического канцерогенеза у беременных крыс (Çağatay et al., 2005; Barth, Kaur, 2009; Huszthy et al., 2012). В нашем исследовании, при культивировании *in vitro*, клетки глиомы С6 образуют три морфологических изотипа, что, вероятно, объясняется сочетанием воздействия внешних факторов с влиянием внутренних механизмов. Отсутствие строгого генетического контроля, высокие темпы пролиферации в ситуации ограниченности ресурсов и ряд других условий быстро задают им новый вектор морфологии. Жесткие конкурентные условия среды потенцируют дальнейшее функционирование механизмов патологической эволюции, способствуя формированию более жизнеспособных и устойчивых к внешнему воздействию клеточных популяций.

В проведенных нами исследованиях клетки глиомы линии С6 интенсивно окрашивались маркерами нейральных стволовых клеток – GFAP, nestin, CXCR4, что в сочетании с положительной окраской на мутантный белок p53 позволяет, наряду с исследованиями других авторов (Sanai et al.,

2005; Wang et al., 2009), считать их нейральными стволовыми клетками, содержащими мутации одного из ключевых регуляторов клеточного цикла. Конечно, нельзя исключить и образование опухолевых стволовых клеток непосредственно из мутировавших глиоцитов, путем активации программы эпителиально-мезенхимального перехода или образования новых опухолевых стволовых клеток, благодаря клеточному слиянию между здоровыми СК и другими мутировавшими клетками, процессы которых описаны в литературных источниках (Dittmar et al., 2012; Lu, Kang, 2011; Lazova et al., 2013). Однако схожесть по основным иммуноцитохимическим маркерам клеточной поверхности, единству ключевых генов и эпигенетических механизмов, регулирующих основные жизненные процессы, сходство протеомного и транскриптомного профиля свидетельствует в пользу происхождения ОСК глиомы С6 от нейральных стволовых клеток, что доказано в исследованиях зарубежных авторов (Sanai et al., 2005; Vjerkvig et al., 2005; Wu, Cao, 2012). Очевидно, именно нейральные стволовые клетки являются отправной точкой процессов опухолевого роста. Возможно, высокие темпы пролиферации *in vitro* позволяют глиоме С6, до момента имплантации в мозг крыс, накопить некоторое количество «не стволовых» клеток, однако этот аргумент представляется малоубедительным. В нашем эксперименте часть клеток глиомы С6 было иммунофенотипировано к антителам против tubulin- β -3 – нейрональному маркеру, S100 – маркеру глии и oligodendrocyte 4 – белку ранних олигодендроцитов, данное обстоятельство свидетельствует о наличии начальных стадий дифференцировки популяции, но высокое количество нейральных стволовых маркеров – CXCR4, мутантного белка p53 и нестина свидетельствуют об их принадлежности к опухолевому ряду. Наши данные соответствуют данным литературы. Так, в работах показано наличие у клеток опухолей глиального происхождения маркера стволовости – нестина (Veselska et al., 2006; Jin et al., 2013), мутантного белка p53, белка S100, GFAP, tubulin- β -3 (Колотов и др., 2010; Коржевский и др., 2010).

По результатам проведенного исследования сделан вывод, что глиома С6 обладает иммуноцитохимическими признаками нейральных клеток, но наличие мутантного белка p53 и белка стволовых клеток – нестина, определяет данную культуру как опухолевую стволовую с выраженными характеристиками клеток нейрального ряда.

4.3.2. Клинико-функциональная характеристика модели in vivo

Инвазивный рост является комплексной программой, включающей в себя взаимодействие опухолевых клеток с локальным микроокружением, клеточную миграцию, деградацию внутриклеточного матрикса, индукцию клеточной полярности и ряд других, формально независимых процессов и явлений (Çağatay et al., 2005; Ehtesham et al., 2006; Gao et al., 2012; Sahin, Buitenhuis, 2012). Как следует из эксперимента, большое число имплантируемых опухолевых клеток препятствует быстрому развитию инвазивной опухоли. Поскольку критическое значение для развития неопластического процесса имеют ОСК, то возможно, низкие темпы развития опухолей или их отсутствие у крыс третьей группы следует объяснить неэффективным соотношением между ОСК и не стволовыми клетками глиомы линии С6. Очевидно, введение большого числа опухолевых клеток в мозг здоровых и молодых крыс резко стимулирует иммунный ответ, порождает процессы конкуренции между ОСК или запускает иные противоопухолевые механизмы, препятствующие пролиферации. В работах других научных групп, показано, что количество клеток глиомы С6, достаточное для развития опухолей головного мозга составляет от 10^5 до 10^6 клеток (Grobben et al., 2002), но в нашей работе, введение ограниченного числа высокоинвазивных опухолевых клеток (2×10^5) воспроизводит естественное течение опухолевого процесса, когда ОСК сохраняет способности к продуктивному взаимодействию с другими стволовыми и соматическими клетками организма крысы.

Таким образом, развитие экспериментальной опухоли в сжатые сроки с ограниченным числом высокоинвазивных опухолевых клеток воспроизводит сложный каскад межклеточных взаимодействий между ОСК и локальным микроокружением, ведущий к качественному изменению внутритканевой иерархии.

Развитие неврологической симптоматики и других функциональных нарушений при опухолях мозга в большинстве случаев вызвано повышением внутричерепного давления, сдавливанием или разрушением опухолью вещества мозга, нарушением мозгового кровообращения (Bondy et al., 2008; Ohgaki, 2009; Pollo, 2012).

В изолированном ГЭБ головного мозга человека и млекопитающих основная регуляторная роль принадлежит тканеспецифическим нейральным стволовым и прогениторными клеткам (Aboody et al., 2000; Sanai et al., 2005; Conover, Notti, 2008). Вальзен с соавторами описали типичную реакцию мозга на появление опухоли. Имплантация клеток глиобластомы усиливает пролиферацию в герминативных зонах зрелого мозга и стимулирует направленную миграцию нейральных прогениторов в опухоль. Взаимодействуя с неопластическими клетками, нейральные прогениторы препятствуют их репликации, что сдерживает рост опухоли, истощая ресурсы герминативных зон (Walzlein et al., 2008).

В этом ключе прогрессивное нарастание неврологических нарушений у крыс первой группы – от неспецифических симптомов до грубых очаговых, проводниковых и общемозговых расстройств – более свидетельствует о естественном течении опухолевого процесса, вызванного появлением и функциональным доминированием в мозге некоторого критического числа ОСК.

Длительная компенсация функциональных нарушений, отмеченная у крыс третьей экспериментальной группы, свидетельствует о присутствии в системе дополнительных сдерживающих факторов (иммунных, эндокринных, сосудистых) либо их конкуренцией. Одномоментное

появление в организме опухолевых клеток в количестве, превышающем определенные лимиты, не физиологично и в естественных условиях не возможно. Нельзя исключить, что одномоментное появление в мозге большого числа ОСК препятствует установлению эффективных контактов с локальным микроокружением, истощает ресурсы и ведет к их гибели. Отчасти об этом свидетельствует отсутствие опухолей у трети животных.

Таким образом, одномоментная имплантация в головной мозг экспериментальных животных 2×10^5 клеток глиомы линии С6 позволяет быстро сформировать опухоли, которые характеризуются высокой агрессивностью, инвазивным ростом, полиморфизмом и высокими темпами пролиферации опухолевых клеток, ангиогенезом, быстрым формированием очагов некроза.

4.3.3. Гистологическая и иммуногистохимическая характеристика модели *in vivo*

Модели опухоли головного мозга широко используются в экспериментальной нейроонкологии в течение трех десятилетий. Ранее во многих работах авторы активно обсуждали схожесть моделей опухолей головного мозга у лабораторных животных с опухолями человека (Çağatay et al., 2005; Bryant et al., 2008; Barth, Kaur, 2009; Huszthy et al., 2012). В нашей работе стереотаксическая имплантация высокоинвазивных 2×10^5 клеток глиомы линии С6 в головной мозг крыс в сжатые сроки воспроизводит сложный каскад межклеточных взаимодействий между ОСК и местным микроокружением, что позволяет получить экспериментальную модель глиобластомы человека.

Необходимость выбора такой модели выражается в воспроизведении требуемых процессов при наличии опухолей у лабораторных животных. Они должны быть выведены из глиальных клеток, расти предсказуемо как *in vitro*, так и *in vivo* и воспроизводить модели роста, которые имитируют человеческие опухоли головного мозга. Так, используются линии 9L, T9, F98

и RG2 (D74) – модели глиомы, индуцированные химическим путем в крысах; модель RT-2, индуцированная вирусом саркомы птиц, одна из наиболее широко используемых моделей опухоли головного мозга; модель CNS-1, имеющая ряд свойств, важных в экспериментальной нейроонкологии (Barth, Kaur, 2009). Линия клеток глиомы C6 как модель опухоли мозга используется в исследованиях из-за сходства с глиобластомой человека, для понимания многих процессов, таких как туморогенность, инвазия и миграция и др. (Çağatay et al., 2005; Barth, Kaur, 2009; Angelastro, Lamé, 2010; Gao et al., 2012).

В нашей работе после имплантации 2×10^5 высокоинвазивных клеток глиомы C6 лабораторным крысам опухоль морфологически характеризовалась высокой агрессивностью, инвазивным ростом, клеточным полиморфизмом, интенсивной пролиферацией опухолевых клеток, ангиогенезом, быстрым формированием очагов некроза, выраженной реакцией астроцитарной глии, окружающей неопластическую ткань, что полностью соответствует модели человеческой глиобластомы и данным литературы (Çağatay et al., 2005; Barth, Kaur, 2009; Angelastro, Lamé, 2010; Gao et al., 2012). Развитие опухоли сопровождается высокой степенью инфильтрации опухолевого очага и окружающих тканей мозга микроглиальными клетками, что в немалой степени способствует опухолевому росту, метастазированию, инвазии и ангиогенезу. Окраска антителами к белку PCNA свидетельствовала о высоких темпах пролиферации в области опухолевого узла с 14 по 28 сут эксперимента, что очевидно связано с увеличением процессов деления опухолевых клеток, в связи с формированием неопластической кровеносной сети. К 35 сут исследования количество пролиферирующих клеток в опухолевой ткани уменьшилось, возможно, это связано с обширными зонами некрозов и, как следствие, с процессами гипоксической гибели опухолевых клеток.

Опухолевая микроглия возникает из резидентных макрофагов ЦНС (Müller et al., 2015). Моноциты, приходящие из кровеносных сосудов,

взаимодействуя с клетками глиомы, преобразуются в ассоциированные с опухолью макрофаги. Оба типа клеток способны к фагоцитозу, презентации опухолевых антигенов и продукции провоспалительных цитокинов, однако их эффекторные иммунные функции в глиоме, по-видимому, подавляются ОСК. Ассоциированная с опухолью микроглия и макрофаги составляют примерно 30% воспалительных клеток, рекрутируемых глиомой посредством секреции различных факторов, включая хемокины, цитокины и матричные белки (Fonseca, Badie, 2013). Накопление микроглиальных клеток в местах инвазии опухоли в веществе мозга регулируется гипоксией и секрецией различных факторов, что, очевидно, объясняет их присутствие с 1 недели эксперимента.

Опухоль, смоделированная в нашем эксперименте, характеризовалась избыточной продукцией цитокинов, о чем, отчасти, свидетельствуют значительные скопления микроглиальных клеток непосредственно в очаге и прилегающих тканях. Однако с началом процесса гипоксической гибели опухолевых клеток количество микроглии в опухолевой ткани уменьшается. Микроглиальные клетки концентрируются на границе опухолевого очага в области инвазии клеток глиомы в паренхиму мозга. Весьма вероятно, что гипоксия в данном случае является важным индуктором, но не основным регулятором трафика рекрутированных клеток. Активированные GFAP-позитивные глиоциты были отмечены в мозговой ткани, граничащей с опухолью на всех сроках иммуногистохимического анализа и только единичные GFAP-позитивные клетки были выявлены на поздних сроках в самой опухоли (28, 35 сут). В свою очередь, наши данные об отсутствии в опухолевой ткани GFAP-позитивных клеток полностью совпадают с данными других авторов (Grobben et al., 2002). Весьма интересен тот факт, что при иммуноцитохимическом исследовании клетки глиомы С6 экспрессируют GFAP. Напротив, при иммуногистохимическом исследовании данного маркера в опухолевой ткани нами выявлено не было. Скорее всего, опухолевые клетки, после имплантации в головной мозг экспериментальных

животных, в ответ на какие-либо сигналы изменяют соотношение и экспрессию определенных белков. Так, ученые показали, что экспрессия GFAP и виментина – белка промежуточных филаментов, экспрессируемых в мезенхимальных клетках, представляет собой взаимозависимый процесс, т.е. экспрессия GFAP происходит при снижении количества виментина и наоборот (Backhovens et al., 1987).

Таким образом, ОСК при имплантации в мозг способны быстро запустить пролиферативные процессы, что впоследствии, формирует гипоксическую микросреду. Значительную часть клеток опухоли и околоопухолевого пространства составляют микроглиоциты, играющие в процессах инвазивного роста стратегически важную роль.

4.4. Противоопухолевый потенциал гемопоэтических стволовых клеток *in vivo* у животных с глиомой линии С6 до и после экспериментальной химиотерапии

4.4.1. Феномен направленной миграции ГСК к глиоме в головного мозга крыс.

После открытия феномена направленной миграции СК к патологическому очагу в организме, СК стали активно изучаться в этом направлении. Сейчас существует множество работ, в которых предлагается использовать новый потенциальный терапевтический подход – при помощи стволовых клеток доставлять гены или готовые лекарственные молекулы (Auffinger et al., 2013; Bryukhovetskiy et al., 2014; Tran, Damaser, 2015).

Большое внимание уделяют преимущественно мезенхимальным, гемопоэтическим и нейральным стволовым клеткам (Garzón-Muvdi, Quiñones-Hinojosa, 2009; Kosztowski et al., 2009; Donghong et al., 2012; Moller et al., 2013; Hua et al., 2013). Много работ, посвященных исследованию миграции и противоопухолевого эффекта показано на НСК. Но получение клеток нейрального ряда для человека представляет собой очень сложную и

практически не выполнимую задачу. Наиболее оптимальными клеточными линиями можно считать ММСК и ГСК, поскольку их получение из ККМ – отработанный и достаточно безопасный метод (Ng et al., 2009; Sahin, Buitenhuis, 2012).

Миграция стволовых клеток к зоне неопластического очага показана во многих научных исследованиях (Kim et al., 2010; Vogel et al., 2013). В проведенном нами исследовании ГСК, введенные экспериментальному животному с глиомой С6 в системный кровоток, целенаправленно мигрируют в опухоль, используя кровеносное русло. Достигая неопластического очага, они накапливаются в прилегающей к опухоли паренхиме мозга, окружают опухоль и проникают в ее ткань, преимущественно концентрируясь в зонах некроза. Гипоксия – наиболее критический параметр микроокружения глиом (Kaur et al., 2005; Seidel et al., 2010; Kolenda et al., 2011). Будучи максимально выражена в некоторых областях опухоли, гипоксия приводит к гиперпродукции высоко активных молекул многочисленного семейства факторов, индуцируемых гипоксией – HIF-1 α и HIF-2 α . Увеличение секреции опухолевыми клетками HIF-1 α сочетается с гиперпродукцией SDF-1, SCF, uPA, VEGF, HGF и ряда других цитокинов и хемоаттрактантов, привлекающих в неопластический очаг СК (Hu et al., 2014).

Мы предполагаем, что феномен направленной миграции ГСК в неопластический очаг, показанный в нашем эксперименте и описанный в литературе (Kim et al., 2010; Vogel et al., 2013), является комплексным механизмом противоопухолевой защиты, локально осуществляемой СК. Сегодня идентифицировано 79 цитокинов, хемоаттрактантов, факторов роста и более 20 типов рецепторов, управляющих процессами направленной миграции различных типов стволовых клеток в норме и при патологии (Deshmane et al., 2009; Hao et al., 2010; Kimmo et al., 2010; Gao et al., 2012). Центральная роль в этом вопросе отводится взаимодействию фактора SDF-1 α

с рецептором CXCR4 (Ehtesham et al., 2006; Vagima et al., 2011; Ehtesham et al., 2013).

В нашем исследовании показана миграция гемопоэтических стволовых клеток к зоне опухолевого очага, что предполагает участие механизмов, в которых задействованы многочисленные сигнальные каскады. Так, в литературе описано участие SCF/c-kit лиганд-рецепторной оси в канцерогенезе не вызывает сомнений. Доказана её первостепенная роль в процессах метастазирования карциномы поджелудочной железы, инвазивного роста мультиформной глиобластомы, механизмах паранеопластического ангиогенеза и рекруинге нормальных стволовых клеток в опухолевый очаг (Summerfield et al., 2003; Smith et al., 2005).

Роль VEGF/VEGFR лиганд – рецепторной оси в качестве одного из механизмов направленной миграции и хоуминга нейральных стволовых клеток доказана в эксперименте на моделях ишемических, травматических, нейродегенеративных и неопластических заболеваний мозга (Tang et al., 2011; Mărgăritescu et al., 2011). VEGF является одним из важнейших цитокинов, который в процессе эмбрионального развития, совместно с CDF-1 α обеспечивает перемещение пула пролиферирующих нейральных клеток на длительные дистанции, а в зрелом мозге обеспечивает направленную миграцию нейральных предшественников по ростральному миграционному тракту и модулирует рекруитмент нейральных стволовых клеток из нейроваскулярных ниш для мобилизации в область повреждения (Fiedler et al., 2005; Li et al., 2005; Ciamporcero et al., 2015).

В нашей работе, показано, что при трансплантации ГСК в центральную хвостовую вену крысам с опухолью мозга происходит миграция и накопление стволовых клеток вокруг опухоли. Тем не менее, ГСК существенно не улучшают показатели выживаемости экспериментальных животных, что, очевидно, является результатом функционального доминирования опухолевых клеток, но улучшают функциональный статус лабораторных крыс.

4.4.2. Оценка эффективности гемопозитических стволовых клеток при введении в организм животных с глиомой С6 после системного применения химиотерапевтического препарата темозоломид

Лечение глиальных опухолей головного мозга представляет собой одну из самых сложных проблем современной медицины (Vredenburgh et al., 2009; Arko et al., 2010; Arvold, Reardon, 2014; Carlsson et al., 2014). Несмотря на все достижения медицинской науки, выживаемость больных с глиомами близка к нулю. Ситуация не претерпела существенных изменений при сочетании хирургического лечения с облучением (Nieder et al., 2004; Philip-Ephraim et al., 2012; Omuro et al., 2014). Современные химиопрепараты обладают очень высокой токсичностью и рядом необратимых побочных эффектов (Philip-Ephraim et al., 2012; Sherriff et al., 2013). Кроме того, глиальные опухоли растут за гематоэнцефалическим барьером, не проницаемым для большинства фармацевтических молекул. Помимо этого, существует популяция клеток, устойчивая к химиотерапевтическим препаратам (Declèves et al., 2006; Vi et al., 2007).

Современная таргетная терапия улучшила результаты лечения рака различных форм и локализаций, однако принципиально не изменила показателей выживаемости больных с глиальными опухолями (Sullivan et al., 2010; Timotheadou, 2011; Rivenbark et al., 2012). Большинство таргетных препаратов обладают крайне высокой токсичностью, и отсутствием селективности (Chamberlain, 2011; Gil-Gil et al., 2013).

Однако проблема неудовлетворительных результатов лечения глиальных опухолей головного мозга только отчасти вызвана побочными эффектами противоопухолевой терапии. Известно, что химиопрепараты как отдельно, так и в классической комбинации из темозоломида, бевацизумаба и иринотекана способны оказывать мощное противоопухолевое воздействие в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (Vredenburgh et al., 2009; Chamberlain, 2011; Omuro et al., 2014). Главным препятствием, помимо высокой токсичности, является нацеленность воздействия химиопрепаратов только на активно

пролиферирующие опухолевые клетки. Неопластические клетки, инфильтрирующие паренхиму мозга и находящиеся в интерфазе практически недостижимы для конвенционных химиотерапевтических воздействий.

Использование химиопрепарата на экспериментальных животных с наличием опухолей мозга показало, что темозоломид приводит к радикальному уменьшению объема опухоли у лабораторных животных, но в клинической практике и согласно данным литературы эффект химиопрепарата темозоломида зачастую носит паллиативный характер и не оказывает высокого эффекта на продолжительность жизни (Chamberlain, 2010; Omuro et al., 2014). Введение ГСК после курса химиотерапии достоверно ($p < 0,05$) увеличивает продолжительность жизни животных, по сравнению с группой, получавших только темозоломид, что говорит о влиянии стволовых клеток на процессы неоплазии. Таким образом, выживаемость, как главный критерий эффективности терапии в онкологии, с использованием клеточной трансплантации достоверно увеличивается. В работах зарубежных авторов также отмечено положительное влияние стволовых клеток на лабораторных животных с опухолями мозга (Simonsson et al., 2005; Hua et al., 2013).

Темозоломид оказывает выраженное цитотоксическое действие, вызванное алкилированием гуанина в положении O6 и N7, нарушает синтез и структуру ДНК, способствует радикальному уменьшению числа опухолевых клеток, ингибирует процессы пролиферации и ангиогенеза (Chamberlain et al., 2010). Воздействие СК представляется комплексным и сложным. С одной стороны, будучи привлеченными в зону неоплазии поврежденными клетками мозговой паренхимы они продуцируют нейротрофические факторы и ангиогенные субстанции, улучшающие состояние поврежденных клеток, но одновременно стимулирующие процессы опухолевого роста (Fiedler et al., 2005; Kim et al., 2010; Gao et al., 2012). В тоже время, взаимодействуя с опухолевыми клетками, СК подавляют неопластический рост, стимулируя процессы клеточной гибели (Hua et al., 2013). Как и в данной работе, так и в

работах других ученых, показано, что применение темозоломида уменьшает число опухолевых клеток, что принципиально меняет вектор межклеточного взаимодействия в зоне неоплазии (Stupp et al., 2009; Chamberlain, 2010). Процессы клеточной гибели начинают преобладать над процессами ангиогенеза, что способствует уменьшению размеров опухоли и продлеванию жизни экспериментальных животных.

С позиций антагонистического взаимоотношения ОСК и здоровых НСК развитие опухоли в головном мозге следует понимать, как результат локального преобладания и функционального доминирования клеток неопластического вида. Трансплантация клеток глиомы линии С6, содержащей высокое число ОСК, приводит к одномоментному срыву механизмов ауторегуляции, тканевого гомеостаза в мозге крысы, что позволяет быстро сформировать сосудистую, лимфатическую и нейральную сети, оптимизировать метаболизм и беспрепятственно, с максимальной скоростью запустить инвазивные процессы, что объясняет тяжесть состояния и высокую смертность животных в контрольной группе.

Темозоломид достоверно уменьшает объем глиомы, что было доказано в нашем эксперименте и соответствует данным литературы (Stupp et al., 2009; Chamberlain, 2010). Действие препарата в отношении опухолевых клеток редуцирует объем опухолевого узла, но резко усиливает гипоксию, что очевидно, способствует выбросу хемокинов, индуцирующих процессы направленной миграции СК в опухолевый очаг. Появление такого фактора как мигрировавшие в очаг нормальные СК резко смещает равновесие в противоположную сторону, что объясняет увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных, как главного критерия компенсации в данной системе.

Трансплантированные ГСК способны замедлять интенсивность пролиферации опухолевых клеток. Гибель клеток глиомы С6 при взаимодействии с ГСК может быть вызвана нарушением внутриклеточного гомеостаза ионов кальция, а инструктивный специфический сигнал передан

через щелевые межклеточные контакты посредством BMP4 и интерлейкина-11 (Blank et al., 2008). Нейропластическое действие СК и продукцию биологически активных веществ СК в патологическом очаге также следует отнести к числу механизмов противоопухолевого действия ГСК.

Ранее Брюховецкий с соавторами сообщали о возможности развития апоптоза в клетках глиальных опухолей при взаимодействии с НСК и клетками-предшественницами гемопоэза (Брюховецкий, Брюховецкий, 2011; Брюховецкий и др., 2013). Эти клеточные системы при совместном культивировании с клетками глиомы C6 и глиобластомы U87 индуцируют в них апоптоз и замедляют темпы развития неопластического процесса. Возможно, именно этот механизм редуцирует объем опухолевого узла и улучшает общее состояние крыс в ходе эксперимента. Нельзя исключить и того, что гибель клеток опухоли активизирует механизмы выживания ОСК, выступает как фактор селекции, отбирающий наиболее агрессивные и резистентные клеточные элементы.

Трансплантация СК с модифицированными регуляторными и противоопухолевыми свойствами может сдвинуть вектор неопластического процесса в сторону апоптоза, нарушить иерархию опухолевых клеток и запустить иные регуляторные механизмы (Lathia et al., 2011).

Как правило, глиальные опухоли возникают в возрасте 45-65 лет, когда количество СК в зрелом мозге существенно уменьшается (Bouab et al., 2011; Conover, Shook, 2011; Kennedy et al., 2012; Franco et al., 2015). Кроме того, они накапливают мутации, снижающие их регуляторный потенциал.

Стало очевидно, что активно пролиферирующая клетка представляет собой оптимальный объект для воздействия внешних факторов и, накопив некое критическое количество мутаций, при сохранении способности к миграции и активному межклеточному взаимодействию и возможности порождать клетки различных типов, становится движущей силой неопластического процесса (Sanai et al., 2005; Dittmar et al., 2012; Bu, Cao, 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном разделе считаем необходимым обсудить следующие разделы:

1. Антипролиферативный потенциал гемопоэтических стволовых клеток *in vitro* в отношении модели глиомы линии С6;
2. Особенности антипролиферативного эффекта гемопоэтических стволовых клеток в отношении глиомы С6 *in vitro*;
3. Экспериментальную модель мультиформной глиобластомы *in vivo*;
4. Противоопухолевый потенциал гемопоэтических стволовых клеток *in vivo* у животных с глиомой линии С6 до и после экспериментальной химиотерапии.

Идентификация типа клеток, инициирующих и поддерживающих опухолевый рост, была и остается одной из магистральных задач онкологии. Тканеспецифические СК головного мозга высших млекопитающих и человека представляют собой комплексный саногенетический инструмент обеспечивающий выживание, компенсацию и восстановление нейроцитов, обеспечивающий пластичность нервной ткани и модулирующий ее функциональные возможности. В силу специфики своих функций нейральные СК постоянно образуются в субвентрикулярной зоне и других герминативных центрах зрелого мозга и мигрируют по ростральному миграционному тракту на протяжении всей жизни индивида (Batista et al., 2014).

Считаем необходимым подчеркнуть, что теория происхождения глиальных опухолей от собственных НСК, описанная в работе (Batista et al., 2014) получила в нашей работе ряд важных аргументов. Изначальной способностью порождать клетки различных видов в головном мозге обладают именно НСК (Sanai et al., 2005). Мигрировавшие в мозг гемоцитобласты в существенно меньшей степени вовлечены в этот процесс. Клетки глиомы линии С6, как было показано в нашем исследовании, при сохранении иммуноцитохимического профиля стволовых клеток

оказываются способными порождать морфологические элементы нейрального и глиального иммунофенотипа.

Принципиальной особенностью и стратегическим отличием клеток глиомы С6 от «нормальных» нейральных стволовых клеток является наличие мутантной формы белка p53. Весьма вероятно, что именно эта стратегическая мутация является маркером ряда важнейших мутационных изменений, обеспечивающих появление ключевого и самого основного отличительного свойства этого типа клеток – способности к пролиферации и инвазивному росту. Указанные характеристики делают принципиально важным установление специфических особенностей и идентификацию основных механизмов мутационного процесса.

Изучение специфических процессов взаимодействия между стволовыми и опухолевыми клетками принципиально важно для понимания механизмов локального противоопухолевого гомеостаза в головном мозге. В процессе совместного культивирования ГСК подавляют рост глиомы С6, обнаруживая отчетливую тенденцию к усилению противоопухолевой эффективности ГСК по мере роста их количественного превосходства над опухолевыми клетками. Очевидно, ситуация локального преобладания или функционального доминирования клеток определенного типа играет в этой ситуации решающую роль.

Именно функциональным доминированием в мозге здоровых, содержащих минимум мутационных изменений СК, следует объяснить минимальные показатели встречаемости глиальных опухолей высокой степени злокачественности у молодых и преобладание этой патологии в старшей возрастной группе (Stoll et al., 2013; Tabouret et al., 2013). Именно с возрастом НСК, непрерывно пролиферируя под действием канцерогенных влияний, накапливают мутации, что запускает специфические противоопухолевые механизмы в виде падения темпов нейрогенеза в зрелом мозге.

Преобладание глиом высокой степени злокачественности, а именно глиобластомы, более типично для пожилых людей, и очевидно, связано с резким увеличением продолжительности жизни человека (Tabouret et al., 2013; Franco et al., 2015). В этом ключе, существует точка зрения, что рак и другие онкологические заболевания представляют собой закономерный этап старения организма и естественный регуляторный механизм, достоверно гарантирующий биологическое устранение индивида, потерявшего все шансы на успех в размножении. Однако увеличение продолжительности жизни – закономерное следствие стратегических завоеваний человечества, сделавших возможным построение современного мира и общества. В этой связи рак следует рассматривать не только как фатальное заболевание отдельного человека, но и серьезный вызов всему человечеству.

Нам удалось идентифицировать один из механизмов подавления пролиферации опухолевых клеток – протеомный обмен между ГСК и клетками глиомы. На данном этапе эксперимента следует ограничиться констатацией факта, что такой механизм есть и он достоверно обеспечивает торможение пролиферации опухолевых клеток. Но, возможно, обмен регуляторными межклеточными белками есть проявление другого, более сложного и комплексного процесса – феномена клеточного слияния, в результате которого образуются цитогибриды с функциями стволовых и опухолевых клеток одновременно. Возможно, в этой ситуации важную роль будут играть эпигенетические влияния, которые инактивируют онкогены и тормозят репликацию опухолевых клеток, однако нельзя утверждать, что эти «новые» клетки не способны образовывать новые опухоли и описанный процесс не представляет собой механизм формирования опухолевых стволовых клеток *de novo*, что требует продолжения исследований.

Моделирование глиобластомы *in vivo* представляет собой одну из самых не тривиальных задач экспериментальной онкологии. Полученная модель должна полностью воспроизводить комплексную морфогенетическую программу инвазивного роста, быть клинически

адекватной и воспроизводимой. В данной работе мы использовали стереотаксическую трансплантацию клеток глиомы линии С6 в головной мозг крыс породы Вистар путем введения 2×10^5 опухолевых клеток, что в сжатые сроки воспроизводило сложный каскад взаимодействий между ОСК и позволило получить экспериментальную модель глиобластомы человека. С морфологических позиций опухоль характеризовалось инвазивным ростом, высокой степенью полиморфизма и интенсивной пролиферацией опухолевых клеток, ангиогенезом, быстрым формированием очагов некроза, выраженной реакцией астрацитарной глии, которая продуцируют нейротрансмиттеры, сдерживающие неопластическую инвазию. Напротив, микроглиоциты, инфильтрирующие опухоль, концентрируются в зонах инвазивного роста, сопровождают миграцию опухолевых клеток в паренхиме мозга и, очевидно, являются проводником этого процесса.

Существенный интерес представляют темпы развития глиальных опухолей при трансплантации в головной мозг экспериментальных животных различного количества клеток глиомы С6. Наиболее быстрое развитие опухолей свойственно крысам первой группы (2×10^5 клеток). Указанное обстоятельство убедительно свидетельствует, что появление в головном мозге ограниченно достаточного количества ОСК способствует быстрому и эффективному установлению контактов с локальным микроокружением. Однако стратегически важным условием реализации данного процесса является установление прочных контактов со вспомогательными клетками, которые располагались бы вокруг них, а факторы дифференциации находились далеко. В этой ситуации ОСК способны запускать программу инвазивного роста. В случае введения предельно высокого числа клеток глиомы С6 (2×10^6) они не могут установить эффективных нутритивных взаимоотношений с локальным микроокружением и гибнут от истощения энергетических ресурсов, воздействия иммунных и эндокринных механизмов.

В нашей работе использована ксенотрансплантация ГСК. Безусловно, с клинических позиций такой подход не представляется перспективным. Однако с позиций целей и задач эксперимента использование лабораторных крыс породы Вистар позволяет сформировать специфическую картину опухоли, идентичной глиобластоме человека. Темозоломид уменьшает объем опухоли. Появление такого фактора как мигрировавшие в очаг нормальные СК резко смещает равновесие в противоположную сторону, что объясняет увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных, как главного критерия компенсации в данной системе.

В данной работе мы положили основу изучению особенностей и системных механизмов течения неопластического процесса в головном мозге крыс при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток после экспериментальной химиотерапии с использованием одного из самых современных противоопухолевых препаратов для лечения глиобластомы. Главным выводом исследования является достоверный факт, что применение препарата СК после химиотерапии достоверно увеличивает выживаемость животных с глиомой С6, что является самым важным критерием в современной онкологии.

ВЫВОДЫ

1. Гемопозитические стволовые клетки *in vitro* тормозят пролиферацию клеток глиомы С6; выраженность антипролиферативного эффекта гемопозитических стволовых клеток в отношении клеток глиомы С6 возрастает по мере увеличения числа гемопозитических стволовых клеток в культуре.
2. В процессе взаимодействия гемопозитических стволовых и опухолевых клеток *in vitro* при изначальном соотношении 1:1 наблюдается обмен цитоплазматическими белками, в ходе которого количество гемопозитических стволовых клеток в смешанной культуре уменьшается.
3. Клетки глиомы линии С6 имеют иммунофенотипические признаки опухолевых стволовых клеток: содержат $96,7 \pm 6,8\%$ нестин-положительных клеток, $19,63 \pm 4,92\%$ CXCR4-положительных клеток и $88,4 \pm 3,8\%$ клеток, окрашенных к мутантному белку p53.
4. Имплантация клеток глиомы линии С6 в головной мозг лабораторных крыс позволяет в сжатые сроки получить инвазивную опухоль, идентичную мультиформной глиобластоме человека.
5. Трансплантация гемопозитических стволовых клеток в организм животного с экспериментальной глиобластомой улучшает функциональный статус лабораторных животных.
6. Введение гемопозитических стволовых клеток после применения цитостатического химиопрепарата темозоломид снижает темпы прогрессирования опухоли, уменьшает размеры опухолевого узла и увеличивает выживаемость животных с экспериментальной глиобластомой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Брюховецкий А.С., Брюховецкий И.С.* Концепция циторегуляторной терапии злокачественных глиальных опухолей головного мозга: новая теоретическая и методологическая платформа применения клеточных технологий в нейроонкологии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6, № 2. С. 93-103.
2. *Брюховецкий А.С., Шевченко В.Е., Чехонин В.П., Брюховецкий И.С., Ковалев С.В., Баклаушев В.П., Давыдов М.И.* Сравнительное протеомное картирование опухолевых стволовых клеток, выделенных из глиобластомы линии U87, нейрональных стволовых и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека: от каталогизации клеточных белков к инновационной парадигме протеом-основанной клеточной терапии опухолей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 2. С. 85-92.
3. *Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Кумейко В.В., Мищенко П.В., Хотимченко Ю.С.* Стволовые клетки в канцерогенезе мультиформной глиобластомы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013. Т. 8, № 2. С. 13-19.
4. *Ермоленко А.Е.* Этиологическая классификация опухолей и механизмы канцерогенеза [Электронный ресурс] // Математическая морфология. 2012. Т. 11, № 2. Режим доступа: <http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/TITL.HTM>
5. *Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А.* Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // Acta naturae. 2011. Т. 3, № 4. С. 32-39.
6. *Корниенко В.Н.* Опухоли головного мозга // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2004. Т. 15. № 1-2. С. 23-30.
7. *Мяделец О.Д., Кичигина Т.Н., Грушин В.Н., Мяцелец Н.Я., Мяделец М.О., А.А. Максимов* и его революционное учение о мезенхимных стволовых

клетках // Вестник витебского государственного медицинского университета. 2007. Т. 6, №3. С.1-12.

8. *Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G., Bower K.A., Liu S., Yang W., Small J.E., Herrlinger U., Ourednik V., Black P.M., Breakefield X.O., Snyder E.Y.* Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000. Vol. 97, № 23. P. 12846-12851.
9. *Albesiano E., Han J.E., Lim M.* Mechanisms of local immunoresistance in glioma // *Neurosurgery Clinics of North America*. 2010; Vol. 21, № 1. P. 17-29.
10. *Altaner C.* Glioblastoma and stem cells // *Neoplasma*. 2008. V. 55, №5. P. 369-374.
11. *Angelastro J.M., Lamé M.W.* Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells // *Molecular Cancer Research*. 2010. Vol. 8, № 8. P. 1105-1115.
12. *Ampie L., Woolf E.C., Dardis C.* Immunotherapeutic advancements for glioblastoma [Электронный ресурс] // *Frontiers in Oncology*. 2015. Vol. 5. P. 12. doi:10.3389/fonc.2015.00012
13. *Arko L., Katsyv I., Park G.E., Luan W.P., Park J.K.* Experimental approaches for the treatment of malignant glioma // *Pharmacology and Therapeutics*. 2010. Vol. 128, № 1. P. 1-36.
14. *Arvold N., Reardon D.* Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient // *Journal of Clinical Interventions in Aging*. 2014. Vol. 9. P. 357- 367.
15. *Auffinger B., Morshed R., Tobias A., Yu C., Atique U.A., Maciej S.L.* Drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells: a potential marriage for the treatment of malignant glioma? // *Oncotarget*. 2013. Vol. 4, № 3. P. 378- 396.

16. *Backhovens H., Gheuens J., Slegers H.* Expression of glial fibrillary acidic protein in rat C6 glioma relates to vimentin and is independent of cell-cell contact // *Journal of Neurochemistry*. 1987. Vol. 49. P. 348-354.
17. *Bader A. G.* miR-34- a microRNA replacement therapy is headed to the clinic [Электронный ресурс] // *Frontiers in Genetics*. 2012. Vol. 3. P. 120. doi:10.3389/fgene.2012.00120
18. *Bajinskis A., Lindegren H., Johansson L., Harms-Ringdahl M., Forsby A.* Low-dose/dose-rate γ radiation depresses neural differentiation and alters protein expression profiles in neuroblastoma SH-SY5Y cells and C17.2 neural stem cells // *Radiation Research*. 2011. Vol. 175, № 2. P. 185-192.
19. *Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N.* Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth // *Cancer Research*. 2008. Vol. 68, № 15. P. 6043-6048.
20. *Bardelli A., Cahill D.P., Lederer G., Speicher M.R., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C.* Carcinogen-specific induction of genetic instability // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. Vol. 98, № 10. P. 5770-5775.
21. *Barani I.J., Larson D.A.* Radiation therapy of glioblastoma // *Cancer Treatment and Research*. 2015. Vol. 163. P. 49-73.
22. *Barrett A.J., Le B.K.* Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia // *Clinical and Experimental Immunology*. 2010. Vol. 161, № 2. P. 223-232.
23. *Barth R.F., Kaur B.* Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas // *Journal of Neuro-Oncology*. 2009. Vol. 94, № 3. P. 299-312.
24. *Batista C. M., Mariano E.D., Barbosa B.J. Pires A., Morgalla M., Marie Nagahashi S.K., Teixeira M.J., Lepski G.* Adult neurogenesis and glial oncogenesis: when the process fails [Электронный ресурс] // *Biomed Research International*. 2014. ID. 438639. doi:10.1155/2014/438639

25. *Benedetti S., Pirola B., Pollo B., Magrassi L., Bruzzone M.G., Rigamonti D., Galli R., Selleri S., Di Meo F., De Fraja C., Vescovi A., Cattaneo E., Finocchiaro G.* Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells // *Nature Medicine*. 2000. Vol. 6, № 4. P. 447- 450.
26. *Behnan J., Isakson P., Joel M., Cilio C., Langmoen I.A., Vik-Mo E.O., Badn W.* Recruited brain tumor-derived mesenchymal stem cells contribute to brain tumor progression // *Stem Cells*. 2014. Vol. 32, № 5. P. 1110-1123.
27. *Bi C.L., Fang J.S., Chen F.H., Wang Y.J., Wu J.* Chemoresistance of CD133(+) tumor stem cells from human brain glioma [Article in chinese] // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2007. Vol. 32, № 4. P. 568-573.
28. *Bjerkvig R., Tysnes B.B., Aboody K.S., Najbauer J., Terzis A.J.* The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights // *Nature Reviews. Cancer*. 2005. Vol. 5, №. 11. P. 899-904.
29. *Blank U., Karlsson G., Karlsson S.* Signaling pathways governing stem-cell fate // *Blood*. 2008. Vol. 111, № 2. P. 492-503.
30. *Bomken S., Fiser K., Heidenreich O., Vormoor G.* Understanding the cancer stem cell // *British Journal of Cancer*. 2010. Vol. 103, №. 4. P. 439-445.
31. *Bondy M.L., Scheurer M.E., Malmer B., Barnholtz-Sloan J.S., Davis F.G., Il'yasova D., Kruchko C., McCarthy B.J., Rajaraman P., Schwartzbaum J.A., Sadetzki S., Schlehofer B., Tihan T., Wiemels J.L., Wrensch M., Buffler P.A.* Brain tumor epidemiology: consensus from the brain tumor epidemiology consortium // *Cancer*. 2008. Vol. 113, № 7. P. 1953-1968.
32. *Bouab M., Paliouras G. N., Aumont A., Forest-Bérard K., Fernandes K.J.* Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood // *Neuroscience*. 2011. Vol. 173. P. 135-149.
33. *Boumber Y., Issa J.P.* Epigenetics in cancer: what's the future? // *Oncology*. 2011. Vol. 25, № 3. P. 220-228.
34. *Bryant M.J., Chuah T.L., Luff J., Lavin M.F., Walker D.G.* A novel rat model for glioblastoma multiforme using a bioluminescent F98 cell line // *Journal of*

- Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia. 2008. Vol. 15, № 5. P. 545-551.
35. *Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S., Chekhonin V., Baklaushev V., Bryukhovetskiy I., Zhukova M.* To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue-specific stem cells of humans // *Cell Transplantation*. 2014. Vol. 23, № 1. P. 151-170.
 36. *Bu Y., Cao D.* The origin of cancer stem cells // *Frontiers in Bioscience*. 2012. Vol. 1, № 4. P. 819-830.
 37. *Burgess R.J., Agathocleous M., Morrison S.J.* Metabolic regulation of stem cell function // *Journal of Internal Medicine*. 2014. Vol. 276, № 1. P. 12-24.
 38. *Cabrera H.N., Almeida A.N., Silva C.C., Fonoff E.T., Martin Md., Leite Cda.C., Teixeira M.J.* Use of intra operative MRI for resection of gliomas // *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2011. Vol. 69, № 6. P. 949-953.
 39. *Çağatay K., Taşkin M.M., Neslihan S. Necati K., Burak E.* Histopathology, invasion, migration and tumorigenicity in the C6 rat glioma model // *Turkish Neurosurgery*. 2005. Vol. 15, № 3. P. 109-115.
 40. *Cahill D.P., Lengauer C., Yu J., Riggins G.J., Willson J.K., Markowitz S.D., Kinzler K.W., Vogelstein B.* Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers // *Nature*. 1998. Vol. 392, № 6673. P. 300-303.
 41. *Carlsson S.K., Brothers S.P., Wahlestedt C.* Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme // *EMBO Molecular Medicine*. 2014. V. 6, № 11. P. 1359-1370.
 42. *Chamberlain M. C.* Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma // *Clinical Medicine Insights*. 2011. Vol. 5. P. 117-129.
 43. *Chamberlain M. C.* Temozolomide: therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas // *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2010. Vol. 10, № 10. P. 1537-1544.

44. *Chang J., Narayana A.* Functional MRI for radiotherapy of gliomas // *Technology in Cancer Research and Treatment*. 2010. Vol. 9, № 4. P. 347-358.
45. *Charron D.* Allogenicity and immunogenicity in regenerative stem cell therapy // *Indian Journal of Medical Research*. 2013. Vol. 138, № 5. P. 749-754.
46. *Cheng L., Alexander R., Zhang S., Pan C.X., MacLennan G.T., Lopez-Beltran A., Montironi R.* The clinical and therapeutic implications of cancer stem cell biology // *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2011. Vol. 11, №. 7. P. 1131-1143.
47. *Cheung T.H., Rando T.A.* Molecular regulation of stem cell quiescence // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. Vol. 14, № 6. P. 329-340.
48. *Chiou S.M.* Survival of brain metastasis patients treated with gamma knife surgery alone // *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2013. Vol. 115, №. 3. P. 260-265.
49. *Chopra H., Hans M.K., Shetty S.* Stem cells-the hidden treasure: A strategic review // *Journal of Dental Research*. 2013. Vol. 10, № 4. P. 421-427.
50. *Chowdhary M., Chibawanye E., Silbergeld D.* Treatment of gliomas: how did we get here? // *Surgical Neurology International*. 2015. Vol. 6, № 1. P. 85-88.
51. *Ciamporzero E., Miles K.M., Adelaiye R., Ramakrishnan S., Shen L., Ku S., Pizzimenti S., Sennino B., Barrera G., Pili R.* Combination strategy targeting VEGF and HGF/c-met in human renal cell carcinoma models // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015. Vol. 14, № 1. P. 101-110.
52. *Clevers H.* The cancer stem cell: premises, promises and challenges // *Nature Medicine* 2011. Vol. 17, №. 3. P. 313-319.
53. *Comings D.* A general theory of carcinogenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973. Vol. 70, № 12. P. 3324-3328.
54. *Conover J.C., Notti R.Q.* The neural stem cell niche // *Cell and Tissue Research*. 2008. Vol. 331, № 1. P. 211-224.

55. *Conover J.C., Shook B.A.* Aging of the subventricular zone neural stem cell niche // *Aging and Disease*. 2011. Vol. 2, № 1. P. 49-63.
56. *Copelan E.A.* Hematopoietic stem-cell transplantation // *The New England Journal of Medicine*. 2006. Vol. 354, № 17. P. 1813-1826.
57. *De Almeida P.E., Ransohoff J.D., Nahid A., Wu J.C.* Immunogenicity of pluripotent stem cells and their derivatives // *Circulation Research*. 2013. Vol. 112, № 3. P. 549-561.
58. *De Almeida S.F., Brunetto A.L., Schwartsmann G., Roesler R., Abujamra A.L.* Glioma revisited: from neurogenesis and cancer stem cells to the epigenetic regulation of the niche // *Journal of oncology*. 2012. Vol. 53. P. 7861-7865.
59. *Decimo I., Bifari F., Krampera M., Fumagalli G.* Neural stem cell niches in health and diseases // *Current Pharmaceutical Design*. 2012. Vol. 18, № 13. P. 1755-1783.
60. *Declèves X., Amiel A., Delattre J.Y., Scherrmann J.M.* Role of ABC transporters in the chemoresistance of human gliomas // *Current Cancer Drug Targets*. 2006. Vol. 6, № 5. P. 433-445.
61. *Dengke M.K., Bonaguidi M.A., Guo-li M., Hongjun S.* Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system // *Cell Research*. 2009. Vol. 19, № 6. P. 672-682.
62. *Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S., Sawaya B.E.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview // *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2009. Vol. 29, № 6. P. 313-326.
63. *Dittmar T., Nagler C., Niggemann B., Zanker K.S.* The dark side of stem cells: triggering cancer progression by cell fusion // *Current Molecular Medicine*. 2012. Vol. 13, № 16. P. 735-750.
64. *Doetsch F.* A niche for adult neural stem cells // *Current Opinion in Genetics and Development*. 2003. Vol. 13, № 5. P. 543-550.
65. *Donghong Z., Joseph N., Alexander A.J., Garcia E., Metz M.Z., Gutova M., Polewski M.D., Gilchrist M., Glackin C.A., Kim S.U., Aboody K.S.* Human

- neural stem cell tropism to metastatic breast cancer // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, № 2. P. 314-325.
66. *Dougherty J.D., Fomchenko E.I., Akuffo A.A., Schmidt E., Helmy K.Y., Bazzoli E., Brennan C.W., Holland E.C., Milosevic A.* Candidate pathways for promoting differentiation or quiescence of oligodendrocyte progenitor-like cells in glioma // *Cancer Research*. 2012. Vol. 72, № 18. P. 4856-4868.
67. *Duesberg P., Li R., Fabarius A., Hehlmann R.* Aneuploidy and cancer: from correlation to causation // *Contributions to Microbiology*. 2006. Vol. 13. P. 16-44.
68. *Duesberg P., Mandrioli D., McCormack A., Nicholson J.M.* Is carcinogenesis a form of speciation? // *Cell Cycle*. 2011. Vol. 10, № 13. P. 2100-2114.
69. *Duesberg P., Stindl R., Hehlmann, R.* Explaining the high mutation rates of cancer cells to drug and multidrug resistance by chromosome reassortments that are catalyzed by aneuploidy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. Vol. 97, № 26. P. 14295-14300.
70. *Dwyer R.M., Khan S., Barry F.P., O'Brien T., Kerin M.J.* Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer [Электронный ресурс] // *Stem Cell Research and Therapy*. 2010. Vol. 1, № 3. P. 25. doi: 10.1186/scrt25
71. *Ehtesham M., Winston J.A., Kabos P., Thompson R.C.* CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness // *Oncogene*. 2006. Vol. 25, № 19. P. 2801-2806.
72. *Ehtesham M., Min E., Issar N.M., Kasl R.A., Khan I.S., Thompson R.C.* The role of the CXCR4 cell surface chemokine receptor in glioma biology // *Journal of Neuro-Oncology*. 2013. Vol. 113, №2. P. 153-162.
73. *Fabian A., Vereb G., Szollosi J.* The hitch hikers guide to cancer stem cell theory: markers, pathways and therapy // *Cytometry Part A*. 2013. Vol. 83, № 1. P. 62-71.
74. *Faltas B.* Cornering metastases: therapeutic targeting of circulating tumor cells and stem cells // *Frontiers in Oncology*. 2012. Vol. 2. P. 68-78.

75. *Felfly H., Haddad G.G.* Hematopoietic stem cells: potential new applications for translational medicine // *Journal of Stem Cells*. 2014. Vol. 9, № 3. P. 163-197.
76. *Ferletta M., Caglayan D., Mokvist L., Jiang Y., Kastemar M., Uhrbom L., Westermarck B.* Forced expression of Sox21 inhibits Sox2 and induces apoptosis in human glioma cells // *International Journal of Cancer*. 2011. Vol. 129, № 1. P. 45-60.
77. *Fiedler J., Leucht F., Waltenberger J., Dehio C., Brenner R.E.* VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. Vol. 334, № 2. P. 561-568.
78. *Figueiró F., Bernardi A., Frozza R.L., Terroso T., Zanotto-Filho A., Jandrey E.H., Moreira J.C., Salbego C.G., Edelweiss M.I., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Battastini A.M.* Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces *in vitro* and *in vivo* glioma growth // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2013. Vol. 9, № 3. P. 516-526.
79. *Fonseca A., Badie B.* Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies [Электронный ресурс] // *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. Vol. 2013. doi: /10.1155/2013/264124
80. *Fortier L.A.* Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications // *Veterinary Surgery*. 2005. Vol. 34, № 5. P. 415-423.
81. *Franco S.S., Raveh-Amit H., Kobolák J., Alqahtani M.H., Mobasheri A., Dinnyes A.* The crossroads between cancer stem cells and aging [Электронный ресурс] // *BMC Cancer*. 2015. Vol. 15, № 1. P. 1. doi:10.1186/1471-2407-15-S1-S1
82. *Frank R.T., Najbauer J., Aboody K.S.* Concise review: stem cells as an emerging platform for antibody therapy of cancer // *Stem Cells*. 2010. Vol. 28, № 11. P. 2048-2087.

83. *Frosina G.* Limited advances in therapy of glioblastoma trigger re-consideration of research policy [Электронный ресурс] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2015. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.013
84. *Galloway M.* CD34 expression in glioblastoma and giant cell glioblastoma // *Clinical Neuropathology*. 2010. Vol. 29, № 2. P. 89-93.
85. *Gao Z., Cheng P., Xue Y., Liu Y.* Vascular endothelial growth factor participates in modulating the C6 glioma-induced migration of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and upregulates their vascular cell adhesion molecule-1 expression // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2012. Vol. 4, № 6. P. 993-998.
86. *Garmy-Susini B., Varner J.A.* Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis // *Lymphatic Research and Biology*. 2008. Vol. 6, № 3-4. P. 155-163.
87. *Garzón-Muvdi T., Quiñones-Hinojosa A.* Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissues // *ILAR Journal*. 2009. Vol. 51, № 1. P. 3-23.
88. *Gepstein L.* Derivation and potential applications of human embryonic stem cells // *Circulation Research*. 2002. Vol. 91, № 10. P. 866-876.
89. *Gil-Gil M., Mesia C., Rey M., Bruna J.* Bevacizumab for the treatment of glioblastoma // *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 2013. Vol. 7. P. 123-135.
90. *Gir P., Oni G., Brown S.A., Mojallal A., Rohrich R.J.* Human adipose stem cells: current clinical applications // *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2012. Vol. 129, № 6. P. 1277-1290.
91. *Golebiewska A., Bougnaud S., Stieber D., Brons N.H., Vallar L., Hertel F., Klink B., Schröck E., Bjerkvig R., Niclou S.P.* Side population in human glioblastoma is non-tumorigenic and characterizes brain endothelial cells // *Brain*. 2013. Vol. 136, № 5. P. 1462-1475.
92. *Gonzalez M.A., Bernad A.* Characteristics of adult stem cells // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. Vol. 741. P. 103-120.

93. *Gordon D.J., Resio B., Pellman D.* Causes and consequences of aneuploidy in cancer // *Nature Reviews Genetics*. 2012. Vol. 13, № 3. P. 189-203.
94. *Greco S.J., Rameshwar P.* Mesenchymal stem cells in drug/gene delivery: implications for cell therapy // *Therapeutic Delivery*. 2012. Vol. 3, № 8. P. 997-1004.
95. *Gregorian C., Nakashima J., Le Belle J., Ohab J., Kim R., Liu A., Smith K.B., Groszer M., Garcia A.D., Sofroniew M.V., Carmichael S.T., Kornblum H.I., Liu X., Wu H.* Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis // *The Journal of Neuroscience*. 2009. Vol. 29, № 6. P. 3095-4008
96. *Grobben B., De Deyn P.P., Slegers H.* Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion // *Cell and Tissue Research*. 2002. Vol.310. P. 257-270.
97. *Hao L., Xiao-lin N., Qi C., Yi-ping Y., Jia-quan L., Yan-ning L.* Nerve growth factor and vascular endothelial growth factor: retrospective analysis of 63 patients with salivary adenoid cystic carcinoma // *International Journal of Oral Science*. 2010. Vol. 2, № 1. P. 35-44.
98. *Henson J.W., Gaviani P., Gonzalez R.G.* MRI in treatment of adult gliomas // *The Lancet Oncology*. 2005. Vol. 6, № 3. P. 167-175.
99. *Heryanto Y.D., Achmad A., Taketomi-Takahashi A., Tsushima Y.* *In vivo* molecular imaging of cancer stem cells // *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015. Vol. 5, № 1. P. 14-26.
100. *Hlaváč V., Brynychová V., Václavíková R., Ehrlichová M., Vrána D., Pecha V., Koževnikovová R., Trnková M., Gatěk J., Kopperová D., Gut I., Souček P.* The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma // *Pharmacogenomics*. 2013. Vol. 14, № 5. P. 515-529.
101. *Hosseini E., Mohsen B., Seyed N., Sepideh M.* The role of stem cells in tumor targeting and growth suppression of gliomas // *Biologics: Targets and Therapy*. 2011. Vol. 5. P. 61-70.

102. *Houthuijzen J.M., Daenen M.G., Roodhart M.L., Voest E.E.* The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression // *British Journal of Cancer*. 2012. V. 106. P. 1901-1906.
103. *Hsieh C.H., Lin Y.J., Wu C.P., Lee H.T., Shyu W.C., Wang C.C.* Livin contributes to tumor hypoxia-induced resistance to cytotoxic therapies in glioblastoma multiforme // *Clinical Cancer Research*. 2015. Vol. 21, № 2. P. 460-470.
104. *Hu Yi-Yang, Fu Luo-An, Li San-Zhong, Chen Y., Li J.C., Han J., Liang L., Li L., Ji C.C., Zheng M.H., Han H.* Hif-1 α and Hif-2 α differentially regulate Notch signaling through competitive interaction with the intracellular domain of Notch receptors in glioma stem cells // *Cancer Letters*. 2014. Vol. 349, № 1. P. 67-76.
105. *Hua L., Zhenjun C., Shaopeng Z.* Apoptosis in glioma-bearing rats after neural stem cell transplantation // *Neural Regeneration Research*. 2013. Vol. 8, №. 19. P. 1793-1802.
106. *Huang J.* Thematic series: Epigenetics in stem cells and cancer // *Cell and Bioscience*. 2013. Vol. 3. P. 38-39.
107. *Huang Y., Enzmann V., Ildstad S.T.* Stem cell-based therapeutic applications in retinal degenerative diseases // *Stem Cell Reviews and Reports*. 2011. Vol. 7, № 2. P. 434-445.
108. *Huang Z., Cheng L., Gurianova O.A., Wu Q., Bao S.* Cancer stem cells in glioblastoma – molecular signaling and therapeutic targeting // *Protein and Cell*. 2010. Vol. 7, № 1. P. 638-655.
109. *Hughes A.D., King M.R.* Nanobiotechnology for the capture and manipulation of circulating tumor cells // *Wires Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2012. Vol. 4. P. 291-309.
110. *Huszthy P.C., Daphu I., Niclou S.P., Stieber D., Nigro J.M., Sakariassen P.Ø., Miletic H., Thorsen F., Bjerkgvig R.* *in vivo* models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives // *Neuro-Oncology*. 2012. Vol. 14, № 8. P. 979- 993.

111. *Ishii T., Eto K.* Fetal stem cell transplantation: past, present, and future // *World Journal of Stem Cells*. 2014. Vol. 6, № 4. P. 404-420.
112. *Iwamoto F.M., Abrey L.E., Beal K., Gutin P.H., Rosenblum M.K., Reuter V.E., DeAngelis L.M., Lassman A.B.* Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma // *Neurology*. 2009. Vol. 73, № 15. P. 1200-1206.
113. *Janiszewska M., Suv`a M.L., Riggi N., Houtkooper R.H., Auwerx J., Clément-Schatlo V., Radovanovic I., Rheinbay E., Provero P., Stamenkovic I.* Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells // *Genes and Development*. 2012. Vol. 26. P. 1926-1944.
114. *Jessen K.R.* Glial cells // *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004. Vol. 36, №10. P. 1861-1867.
115. *Jiang W., Peng J., Zhang Y. et al.* The implications of cancer stem cells for cancer therapy // *International Journal of Molecular Science*. 2012. Vol. 13, № 12. P. 16636-16657.
116. *Jin X., Jin X., Jung J.E., Beck S., Kim H.* Cell surface nestin is a biomarker for glioma stem cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013. Vol. 433, № 4. P. 496-501.
117. *Jin W., Xu X., Yang T., Hua Z.* p53 mutation, EGFR gene amplification and loss of heterozygosity on chromosome 10, 17p in human gliomas // *Chinese Medical Journal*. 2000. Vol. 113, № 7. P. 662-666.
118. *Kaur B., Khwaja F., Severson E., Matheny S.L., Brat D. J., Van Meir E.G.* Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis // *Neuro-Oncology*. 2005. Vol. 7, № 2. P. 134-153.
119. *Kazuki Y., Oshimura M.* Human artificial chromosomes for gene delivery and development of animal models // *Molecular Therapy: the Journal of American Society of Gene Therapy*. 2011. Vol. 19, № 9. P. 1591-1601.
120. *Kennedy S.R., Loeb L.A., Herr A.J.* somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2012. Vol. 133, № 4. P. 118-126.

121. *Kent J.* The fetal tissue economy: from the abortion clinic to the stem cell laboratory // *Social Science and Medicine*. 2008. Vol. 67, № 11. P. 1747-1756.
122. *Kim H.S., Choi D.Y., Yun S.J., Choi S.M., Kang J.W., Jung J.W., Hwang D., Kim K.P., Kim D.W.* Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells // *Journal of Proteome Research*. 2012. Vol. 11, № 2. P. 839-849.
123. *Kim J.H., Bae Kim Y., Han J.H., Cho K.G., Kim S.H., Sheen S.S., Lee H.W., Jeong S.Y., Kim B.Y., Lee K.B.* Pathologic diagnosis of recurrent glioblastoma: morphologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 20 paired cases // *The American Journal of Surgical Pathology*. 2012. Vol. 36, № 4. P. 620-628.
124. *Kim J.H., Lee J.E., Kim S.U., Cho K.G.* Stereological analysis on migration of human neural stem cells in the brain of rats bearing glioma // *Neurosurgery*. 2010. Vol. 66, № 2. P. 333-342.
125. *Kim K.S.* Induced pluripotent stem (iPS) cells and their future in psychiatry // *Neuropsychopharmacology*. 2010. Vol. 35, № 1. P. 346-348.
126. *Kimmo H., Sandeep B., Dawen Z., Aryn H.* Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance // *Neoplasia*. 2010. Vol. 12, № 9. P. 675-684.
127. *Koizumi S., Gu C., Amano S., Yamamoto S., Ihara H., Tokuyam T., Namba H.* Migration of mouse-induced pluripotent stem cells to glioma-conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors // *Oncology Letters*. 2011. Vol. 2, № 2. P. 283-288.
128. *Kolb B., Gibb R.* Brain plasticity and behaviour in the developing brain // *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent*. 2011. Vol. 20, №4. P. 265-276.
129. *Kolenda J., Jensen S.S., Aaberg-Jensen C., Christensen K., Andersen C., Brünner N., Kristensen B.W.* Effects of hypoxia on expression of a panel of

- stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma derived spheroids // Journal of Neurooncology. 2011. Vol. 103. P. 43-58.
130. *Kosztowski T., Zaidi H.A., Quiñones-Hinojosa A.* Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas // Expert Review of Anticancer Therapy. 2009. Vol. 9, № 5. P. 597-612.
131. *Kotecha R.S., Burley K., Junckerstorff R.C., Lee S., Phillips M.B., Cole C.H., Gottardo N.G.* Chemotherapy increases amenability of surgical resection in congenital glioblastoma // Journal of Pediatric Hematology/Oncology. 2012. Vol. 29, № 6. P. 538-544.
132. *Koul D.* PTEN signaling pathways in glioblastoma // Cancer Biology and Therapy. 2008. Vol. 7, № 9. P. 1321-1325.
133. *Kucerova L., Matuskova M., Hlubinova K., Altanerova V., Altaner C.* Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells [Электронный ресурс] // Molecular Cancer. 2010. V. 28, №9. doi: 10.1186/1476-4598-9-129
134. *Kuzmichev A.N., Kim S.K., D'Alessio A.C., Chenoweth J.G., Wittko I.M., Campanati L., McKay R.D.* Sox2 acts through Sox21 to regulate transcription in pluripotent and differentiated cells // Current Biology. 2012. Vol. 22, № 18. P. 1705-1710.
135. *Kwiatkowska A., Nandhu M.S., Behera P., Chiocca E., Viapiano M.S.* Strategies in gene therapy for glioblastoma // Cancers. 2013. Vol.5, № 4. P. 1271-1305.
136. *Laine A.L., Huynh N.T., Clavreul A., Balzeau J., Béjaud J., Vessieres A., Benoit J.P., Eyer J., Passirani C.* Brain tumour targeting strategies via coated ferrociphenol lipid nanocapsules // European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics. 2012. Vol. 81, №.3. P. 690-693.
137. *Larijani B., Esfahani E.N., Amini P., Balzeau J., Béjaud J., Vessieres A., Benoit J.P., Eyer J., Passirani C.* Stem cell therapy in treatment of different diseases // Acta Medica Iranica. 2012. Vol. 50, №2. P. 79-96.

138. *Lathia J.D., Heddleston J.M., Venere M., Rich J.N.* Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment // *Cell Stem Cell*. 2011. Vol. 8, № 5. P. 482-485.
139. *Lazova R., LaBerge G.S., Duvall E., Spoelstra N., Klump V., Sznol M., Cooper D., Spritz R.A., Chang J.T., Pawelek J.M.* A melanoma brain metastasis with a donor-patient hybrid genome following bone marrow transplantation: first evidence for fusion in human cancer [Электронный ресурс] // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 6. doi:10.1371/journal.pone.0066731
140. *Li S., Gu C., Gao Y., Amano S., Koizumi S., Tokuyama T., Namba H.* Bystander effect in glioma suicide gene therapy using bone marrow stromal cells // *Stem Cell Research*. 2012. V. 9, №13. P. 270-276.
141. *Li Z.J., Song B., Liu J., Han J.J., Wang C.X., Zhu Y.X., Xu Z.F.* Inhibitory effect of silencing of HMGB1 gene expression on the invasive and metastatic abilities of MGC-803 gastric cancer cells [Article in Chinese] // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2013. Vol. 35, № 4. P. 244-448.
142. *Li Z.D., Bork J.P., Krueger B., Patsenker E., Schulze-Krebs A., Hahn E.G., Schuppan D.* VEGF induces proliferation, migration and TGF-beta1 expression in mouse glomerular endothelial cells via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. Vol. 334, № 4. P. 1049-1060.
143. *Liu C., Sage J.C., Miller M.R., Verhaak R.G., Hippenmeyer S., Vogel H., Foreman O., Bronson R.T., Nishiyama A., Luo L., Zong H.* Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma // *Cell*. 2011. Vol. 14, № 2. P. 209-221.
144. *Liu L., Rando T.A.* Manifestations and mechanisms of stem cell aging // *The Journal of Cell Biology*. 2011. Vol. 193, № 2. P. 257-266.
145. *Lodish M., Stratakis C.* Endocrine tumours in neurofibromatosis type 1, tuberous sclerosis and related syndromes // *Best Practice and Research Clinical Endocrinology*. 2010. Vol. 24, № 3. P. 439-449.

146. *Loeb L.A., Loeb K.R., Anderson J.P.* Multiple mutations and cancer // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. Vol. 100, № 3. P. 776-781.
147. *Louis D., Holland E., Cairncross G.* Glioma classification a molecular reappraisal // American Journal of Pathology. 2001. V. 159, № 3. P. 779-786.
148. *Louis D.N., Perry A., Burger P., Ellison D.W., Reifenberger G., von Deimling A., Aldape K., Brat D., Collins V.P., Eberhart C., Figarella-Branger D., Fuller G.N., Giangaspero F., Giannini C., Hawkins C., Kleihues P., Korshunov A., Kros J.M., Beatriz L.M., Ng H.K., Ohgaki H., Paulus W., Pietsch T., Rosenblum M., Rushing E., Soylemezoglu F., Wiestler O., Wesseling P.* International society of neuropathology – haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading // Brain Pathology. 2014. Vol. 24, P. 429-435.
149. *Lu X., Kang Y.* Cell fusion hypothesis of the cancer stem cell // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2011. Vol. 714. P. 40-129.
150. *Lunn J.S., Sakowski S.A., Hur J., Feldman E.L.* Stem cell technology for neurodegenerative diseases // Annals of Neurology. 2011. Vol. 70, № 3. P. 353-361.
151. *Majidi J., Barar J., Baradaran B., Abdolalizadeh J., Omid Y.* Target therapy of cancer: implementation of monoclonal antibodies and nanobodies // Human Antibodies. 2009. Vol. 18, № 3. P. 81-100.
152. *Marqués-Torrejón M.Á., Porlan E., Banito A., Gómez-Ibarlucea E., Lopez-Contreras A.J., Fernández-Capetillo O., Vidal A., Gil J., Torres J., Fariñas I.* Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression // Cell Stem Cell. 2013. Vol. 12, № 1. P. 88-100.
153. *Mărgăritescu O., Pirici D., Mărgăritescu C.* VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke // Romanian Journal of Morphology and Embryology. 2011. Vol. 52, № 4. P. 1283-1292.

154. *Mierzwa M., Nyati M., Morgan M., Lawrence T.* Recent advances in combined modality therapy // *Oncologist*. 2010. Vol. 15, № 4. P. 372-381.
155. *Mimeault M., Batra S.K.* Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications // *Ageing Research Reviews*. 2009. Vol. 8, № 2. P. 94-112.
156. *Mimeault M., Batra S.K.* Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2013. Vol. 17, № 1. P. 30-54.
157. *Mimura J., Kosaka K., Maruyama A., Satoh T., Harada N., Yoshida H., Satoh K., Yamamoto M., Itoh K.* Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes // *Journal of Biochemistry*. 2011. Vol. 150, № 2. P. 209-217.
158. *Misso G., Di Martino M.T., De R.G., Farooqi A.A., Lombardi A., Campani V., Zarone M.R., Gullà A., Tagliaferri P., Tassone P., Caraglia M.* Mir-34: A new weapon against cancer? [Электронный ресурс] // *Molecular Therapy–Nucleic Acids*. 2014. Vol. 3, № 9. e195. doi:10.1038/mtna.2014.47
159. *Moller H.G., Rasmussen A.P., Andersen H.H., Johnsen K.B., Henriksen M., Duroux M.* A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion // *Molecular Neurobiology*. 2013. Vol. 47, № 1. P. 131-144.
160. *Morrison S.J., Spradling A.C.* Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life // *Cell*. 2008. Vol. 132, № 4. P. 598-611.
161. *Müller A., Brandenburg S., Turkowski K., Müller S., Vajkoczy P.* Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells // *International Journal of Cancer*. 2015. Vol. 137, № 2. P. 278-288.

162. *Nadig R.R.* Stem cell therapy- Hype or hope? A review // *Journal of Conservative Dentistry*. 2009. Vol. 12, № 4. P. 131-138.
163. *Nazarenko I., Hede S.M., He X., Hedrén A., Thompson J., Lindström M.S., Nistér M.* PDGF and PDGF receptors in glioma // *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2012. Vol. 117, № 2. P. 99-112.
164. *Narita Y.* Current knowledge and treatment strategies for grade II gliomas // *Neurologia Medico-Chirurgica*. 2013. Vol. 57, № 3. P. 429-437.
165. *Ng Y.Y., Baert M.R., de Haas E.F., Pike-Overzet K., Staal F.J.* Isolation of human and mouse hematopoietic stem cells // *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 506. P. 13-21.
166. *Nieder C., Andratschke N., Wiedenmann N., Busch R., Grosu A.L., Molls M.* Radiotherapy for high-grade gliomas. Does altered fractionation improve the outcome? // *Strahlentherapie und Onkologie*. 2004. Vol. 180, № 7. P. 401-407.
167. *Nikaki A., Piperi C., Papavassiliou A.G.* Role of microRNAs in gliomagenesis: targeting miRNAs in glioblastoma multiforme therapy // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2012. Vol, 21. № 10. P. 1475-1488.
168. *Nishimura K., Takahashi J.* Therapeutic application of stem cell technology toward the treatment of Parkinson's disease // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2013. Vol. 36, № 2. 171-175.
169. *Oberstadt M.C., Bien-Möller S., Weitmann K., Herzog S, Hentschel K., Rimmbach C., Vogelgesang S., Balz E., Fink M., Michael H., Zeden J.P., Bruckmüller H., Werk A.N., Cascorbi I., Hoffmann W., Rosskopf D., Schroeder H.W., Kroemer H.K.* Epigenetic modulation of the drug resistance genes MGMT, ABCB1 and ABCG2 in glioblastoma multiforme [Электронный ресурс] // *BMC Cancer*. 2013. Vol. 13. P. 617. doi:10.1186/1471-2407-13-617
170. *Ohgaki H.* Epidemiology of brain tumors // *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 472. P. 323-342.

171. *Ohgaki H., Kleihues P.* The definition of primary and secondary glioblastoma // *Clinical Cancer Research*. 2013. Vol. 19, № 4. P. 764-772.
172. *Omuro A., Beal K., Gutin P., Karimi S., Correa D.D., Kaley T.J., DeAngelis L.M., Chan T.A., Gavrilovic I.T., Nolan C., Hormigo A., Lassman A.B., Mellinshoff I., Grommes C., Reiner A.S., Panageas K.S., Baser R.E., Tabar V., Pentsova E., Sanchez J., Barradas-Panchal R., Zhang J., Faivre G., Brennan C.W., Abrey L.E., Huse J.T.* Phase II study of bevacizumab, temozolomide, and hypofractionated stereotactic radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma // *Clinical Cancer Research*. 2014. V. 20, № 19. P. 5023-5031.
173. *Omuro A., DeAngelis L.M.* Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review // *Journal of the American Medical Association*. 2013. Vol. 310, № 17. P. 1842-1850.
174. *Palmer T.D., Ashby W.J., Lewis J.D., Zijlstra A.* Targeting tumor cell motility to prevent metastasis // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011. Vol. 63, № 8. P. 568-581.
175. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. sixth edition: hard cover edition. 2007. ISBN-10:0125476124
176. *Pavon L.F., Marti L.C., Sibov T.T., Malheiros S.M., Brandt R.A., Cavalleiro S., Gamarra L.F.* *In vitro* analysis of neurospheres derived from glioblastoma primary culture: a novel methodology paradigm [Электронный ресурс] // *Frontiers in Neurology*. 2013. Vol. 4. P. 214. doi:10.3389/fneur.2013.00214
177. *Pedrazzoli F., Chrysantzas I., Dezzani L., Vittorio R., Massimo V., Giammaria S.* Cell fusion in tumor progression: the isolation of cell fusion products by physical methods [Электронный ресурс] // *Cancer Cell International*. 2011. Vol. 11, № 32. doi:10.1186/1475-2867-11-32.
178. *Pellegatta S., Finocchiaro G.* Dendritic cell vaccines for cancer stem cells. *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 568. P. 233-247.

179. *Penforinis P., Pochampally R.* Isolation and expansion of mesenchymal stem cells/multipotential stromal cells from human bone marrow // *Methods in Molecular Biology*. 2011. Vol. 698. P. 11-21.
180. *Peterson S.E., Westra J.W., Paczkowski C.M., Chun J.* Chromosomal mosaicism in neural stem cells // *Methods in Molecular Biology*. 2008. Vol. 438. P. 197-204.
181. *Petrosiute A., Auletta J.J., Lazarus H.M.* Achieving graft-versus-tumor effect in brain tumor patients: from autologous progenitor cell transplant to active immunotherapy // *Immunotherapy*. 2012. Vol. 4, № 11. P. 1139-1151.
182. *Philip-Ephraim E.E., Eyong K.I., Williams U.E., Ephraim R.P.* The role of radiotherapy and chemotherapy in the treatment of primary adult high grade gliomas: assessment of patients for these treatment approaches and the common immediate side effects [Электронный ресурс] // *ISRN Oncology*. 2012. 902178. doi: 10.5402/2012/902178
183. *Pollo B.* Pathological classification of brain tumors // *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular*. 2012. Vol. 56, № 2. P. 103-111.
184. *Porada C.D., Almeida-Porada G.* Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010. Vol. 62. № 12. 1156-1166.
185. *Qiao G., Li Q., Peng G., Ma J., Fan H., Li Y.* Similarity on neural stem cells and brain tumor stem cells in transgenic brain tumor mouse models // *Neural Regeneration Research*. 2013. Vol. 8, № 25. P. 2360-2369.
186. *Reilly K.* Brain tumor susceptibility: the role of genetic factors and uses of mouse models to unravel risk // *Brain Pathology*. 2009. Vol. 19, № 1. P. 121-131.
187. *Rivenbark A., Stolzenburg S., Beltran A., Yuan X., Rots M.G., Strahl B.D., Blancafort P.* Epigenetic reprogramming of cancer cells via targeted DNA methylation // *Epigenetics*. 2012. Vol. 7, № 4. P. 350-360.

188. *Rivera M., Sukhdeo K., Yu J.* Ionizing radiation in glioblastoma initiating cells [Электронный ресурс] // *Frontiers in Oncology*. 2013. Vol. 3. P. 74. doi:10.3389/fonc.2013.00074
189. *Sahin A.O., Buitenhuis M.* Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells // *Cell Adhesion and Migration*. 2012. Vol. 6, № 1. P. 39-48.
190. *Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M.S.* Neural stem cells and the origin of gliomas // *The New England Journal of Medicine*. 2005. Vol. 353, № 8. P. 811-822.
191. *Sanai N., Berger M.S.* Glioma extent of resection and its impact on patient outcome // *Neurosurgery*. 2008. Vol. 62, № 4. P. 753-764.
192. *Sareen D., McMillan E., Ebert A.D., Shelley B.C., Johnson J.A., Meisner L.F., Svendsen C.N.* Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells [Электронный ресурс] // *PloS One*. 2009. Vol. 10. № 4. P. e7630. doi: 10.1371/journal.pone.0007630.
193. *Schnarr K., Mooney R., Wenq Y., Zhao D., Garcia E., Armstrong B., Annala A.J., Kim S.U., Aboody K.S., Berlin J.M.* Gold nanoparticle-loaded neural stem cells for photothermal ablation of cancer // *Advanced Healthcare Materials*. 2013. Vol. 7, № 2. P. 976-982.
194. *Scott A.M., Allison J.P., Wolchok J.D.* Monoclonal antibodies in cancer therapy [Электронный ресурс] // *Cancer Immunity*. 2012. Vol. 12. P. 14. PMID: PMC3380347
195. *Seidel S., Garvalov B.K., Wirta V., von Stechow L., Schänzer A., Meletis K., Wolter M., Sommerlad D., Henze A.T., Nistér M., Reifenberger G., Lundeberg J., Frisén J., Acker T.* A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α // *Brain*. 2010. Vol. 133, № 4. P. 983-995.
196. *Sell S.* Alpha-fetoprotein (afp), stem cells, and cancer: how study of the production of afp during chemical hepatocarcinogenesis led to reaffirmation

- of the stem cell theory of cancer // *Tumor Biology*. 2008. Vol. 29, № 3. P. 161-180.
197. *Shufaro Y., Reubinoff B.E.* Therapeutic applications of embryonic stem cells // *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2004. Vol. 18, № 6. P. 909-927.
198. *Silva-Vargas V., Crouch E.E., Doetsch F.* Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging // *Current Opinion in Neurobiology* 2013. Vol. 23, №6. P. 935-942.
199. *Simonsson B., Oberg G., Bjoreman M., Bjorkholm M., Carneskog J., Karlsson K., Gahrton G., Grimfors G., Hast R., Karle H., Linder O., Ljungman P., Nielsen J.L., Nilsson J., Lofvenberg E., Malm C., Olsson K., Olsson-Stromberg U., Paul C., Stenke L., Stentoft J., Turesson I., Udén A.M., Wahlin A., Vilén L., Weis-Bjerrum O.* Intensive treatment and stem cell transplantation in chronic myelogenous leukemia: long-term follow-up // *Acta Haematologica*. 2005. Vol. 113, № 3. P. 155-162.
200. *Stoll E.A., Horner P.J., Rostomily R.C.* The impact of age on oncogenic potential: tumor-initiating cells and the brain microenvironment // *Aging Cell*. 2013. Vol. 12, № 5. P. 733-741.
201. *Shah A.H., Bregy A., Heros D.O., Komotar R.J., Goldberg J.* Dendritic cell vaccine for recurrent high-grade gliomas in pediatric and adult subjects: clinical trial protocol // *Neurosurgery*. 2013. Vol. 73, № 5. P. 863-867.
202. *Sherriff J., Tamangani J., Senthil L., Cruickshank G., Spooner D., Jones B., Brookes C., Sanghera P.* Patterns of relapse in glioblastoma multiforme following concomitant chemoradiotherapy with temozolomide [Электронный ресурс] // *The British Journal of Radiology*. 2013. Vol. 86, № 1022. doi:10.1259/bjr.20120414
203. *Sheweita S.A., Sheikh B.Y.* Can dietary antioxidants reduce the incidence of brain tumors? // *Current Drug Metabolism*. 2011. Vol. 12, № 6. P. 587-593.
204. *Shi L., Zhang S., Feng K., Wu F., Wan Y., Wang Z., Zhang J., Wang Y., Yan W., Fu Z., You Y.* MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells

- resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis // International Journal of Oncology. 2012. Vol. 40. P. 119-129.
205. *Shirai K., Chakravarti A.* Towards personalized therapy for patients with glioblastoma // Expert Review of Anticancer Therapy. 2011. Vol. 11, № 12. P. 1935-1944.
206. *Schor N.* Pharmacotherapy for adults with tumors of the central nervous system // Pharmacology and therapeutics. 2009. Vol. 121, № 3. P. 253-264.
207. *Schu S., Nosov M., O'Flynn L., Shaw G., Treacy O., Barry F., Murphy M., O'Brien T., Ritter T.* Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells // Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2012. Vol. 16, № 9. P. 2094-2103.
208. *Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A.* Cancer statistics // A Cancer Journal for Clinicians 2015. V. 65. P. 5-29.
209. *Smith A.L., Ellison F.M., McCoy J.P., Chen J.* c-Kit expression and stem cell factor-induced hematopoietic cell proliferation are up-regulated in aged B6D2F1 mice // Journals of Gerontology. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences. 2005. Vol. 60, № 4. P. 448-456.
210. *Sinkovics J.G.* Antileukemia and antitumor effects of the graft-versus-host disease: a new immunovirological approach // Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 2010. Vol. 57, № 4. P. 253-347.
211. *Sonnenschein C., Soto A.M.* Theories of carcinogenesis: an emerging perspective // Seminars in Cancer Biology. 2008. Vol. 18, № 5. P. 372-377.
212. *Sontheimer H.* A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors // Journal of Neurochemistry. 2008. Vol. 105, № 2. P. 287-295.
213. *Soto A.M., Sonnenschein C.* The tissue organization field theory of cancer: A testable replacement for the somatic mutation theory // Bioessays. 2011. Vol. 33, № 5. P. 332-340.
214. *Soto A.M., Sonnenschein C.* One hundred years of somatic mutation theory of carcinogenesis: Is it time to switch? // Bioessays. 2014. Vol. 36, № 1. P. 118-120.

215. *Soung Y.H., Lee J.W., Nam S.W., Lee J.Y., Yoo N.J., Lee S.H.* Mutational analysis of AKT1, AKT2 and AKT3 genes in common human carcinomas // *Oncology*. 2006. Vol. 70, № 4. P. 285-289.
216. *Souweidane M.M., Luther N.* Endoscopic resection of solid intraventricular brain tumors // *Journal of Neurosurgery*. 2006. Vol.105, № 2. P. 271-278.
217. *Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., van den Bent M.J., Taphoorn M.J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes A.A., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht C.J., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross J.G., Mirimanoff R.O.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomized phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial // *The Lancet Oncology*. 2009. Vol. 10, № 5. P. 459-466.
218. *Sukhdeo K., Hambarzumyan D., Rich J.N.* Glioma development: where did it all go wrong? // *Cell*. 2011. Vol. 146, № 2. P. 187-188.
219. *Sullivan J.P., Minna J.D., Shay J.W.* Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy // *Cancer Metastasis Review*. 2010. Vol. 29, № 1. P. 61-72.
220. *Summerfield A., Horn M.P., Lozano G., Carrasco C.P., Atze K., McCullough K.* C-kit positive porcine bone marrow progenitor cells identified and enriched using recombinant stem cell factor // *Journal of Immunological Methods*. 2003. Vol. 280, № 1-2. P. 113-123.
221. *Tabatabai G., Weller M.* Glioblastoma stem cells // *Cell and Tissue Research*. 2011. Vol. 343, № 3. P. 459-465.
222. *Tabouret E., Tassy L., Chinot O., Créteil E., Retornaz F., Rousseau F.* High-grade glioma in elderly patients: can the oncogeriatrician help? // *Journal of Clinical Interventions in Aging*. 2013. Vol. 8. P. 1617-1624.

223. *Tan Y., Ooi S., Wang L.* Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells and their derivatives: genetic and epigenetic perspectives // *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2014. Vol. 9, № 1. P. 63-72.
224. *Tang J.M., Wang J.N., Zhang L., Zheng F., Yang J.Y., Kong X., Guo L.Y., Chen L., Huang Y.Z., Wan Y., Chen S.Y.* VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart // *Cardiovascular Research*. 2011. Vol. 91. № 3. P. 402-411.
225. *Tasoglu S., Demirci U.* Bioprinting for stem cell research // *Trends in Biotechnology*. 2013. Vol. 31, № 1. P. 10-19.
226. *Terry M.B., Howe G., Pogoda J.M., Zhang F.F., Ahlbom A., Choi W., Giles G.G., Little J., Lubin F., Menegoz F., Ryan P., Schlehofer B., Preston-Martin S.* An international case-control study of adult diet and brain tumor risk: a histology-specific analysis by food group // *Annals of Epidemiology*. 2009. Vol. 19, № 3. P. 161-171.
227. *Thiel G.* How Sox2 maintains neural stem cell identity [Электронный ресурс] // *Biochemical Journal*. 2013. Vol. 450. № 3. e1-2. doi: 10.1042/BJ20130176.
228. *Thomas A.A., Brennan C.W., DeAngelis L.M., Omuro A.M.* Emerging therapies for glioblastoma // *Journal of the American Medical Association Neurology*. 2014. Vol. 71, № 11. P. 1437-1444.
229. *Timotheadou E.* New agents targeting angiogenesis in glioblastoma [Электронный ресурс] // *Chemotherapy Research and Practice*. 2011. ID878912. doi:10.1155/2011/878912.
230. *Tobias A.L., Thaci B., Auffinger B., Rincón E., Balyasnikova I.V., Kim C.K., Han Y., Zhang L., Aboody K.S., Ahmed A.U., Lesniak M.S.* The timing of neural stem cell-based virotherapy is critical for optimal therapeutic efficacy when applied with radiation and chemotherapy for the treatment of glioblastoma // *Stem Cell Translational Medicine*. 2013. Vol. 9, № 2. P. 655-666.

231. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics // *Cancer Journal for Clinicians*. 2015. V. 65. P. 87-108.
232. Torsvik A., Røslund G.V., Bjerkvig R. Spontaneous transformation of stem cells *in vitro* and the issue of cross-contamination // *International Journal of Biological Sciences*. 2012. Vol. 8, № 7. P. 1051-1052.
233. Tran C., Damaser M.S. Stem cells as drug delivery methods: application of stem cell secretome for regeneration // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015. Vol. 82-83. P. 1-11
234. Tupper D.E., Wallace R.B. Utility of the neurological examination in rats // *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 1980. Vol. 40. P. 999-1003.
235. Uhm J.H., Ballman K.V., Wu W., Giannini C., Krauss J.C., Buckner J.C., James C.D., Scheithauer B.W., Behrens R.J., Flynn P.J., Schaefer P.L., Dakhill S.R., Jaeckle K.A. Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed grade 4 astrocytoma: mayo/north central cancer treatment group study N0074 // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2011. Vol. 80, № 2. P. 347-353.
236. Upadhyay N., Waldman A.D. Conventional MRI evaluation of gliomas // *The British Journal of Radiology*. 2011. Vol. 84, № 2. P. 107-111.
237. Van G.S., Maes W, Ardon H., Verschuere T., Van Cauter S., De Vleeschouwer S. Dendritic cell therapy of high-grade gliomas // *Brain Pathology*. 2009. Vol. 19, № 4. P. 694-712.
238. Vanhecke E., Adriaenssens E., Verbeke S., Meignan S., Germain E., Berteaux N., Nurcombe V., Le Bourhis X., Hondermarck H. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival // *Clinical Cancer Research*. 2011. Vol. 17, № 7. P. 1741-1752.
239. Vagima Y., Lapid K., Kollet O., Goichberg P., Alon R., Lapidot T. Pathways implicated in stem cell migration: the SDF-1/CXCR4 axis // *Methods in Molecular Biology*. 2011. Vol. 750. P. 277-289.

240. *Veselska R., Kuglik P., Cejpek P., Svachova H., Neradil J., Loja T., Relichova J.* Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme [Электронный ресурс] // *BMC Cancer*. 2006. Vol. 6. P. 32. doi:10.1186/1471-2407-6-32
241. *Vinogradov S., Wei X.* Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine // *Nanomedicine*. 2012. Vol. 7, № 4. P. 597- 615.
242. *Vogel S., Peters C., Etminan N., Börger V., Schimanski A., Sabel M.C., Sorg R.V.* Migrations of mesenchymal stem cells towards glioblastoma cells depend on hepatocyte growth factor in is enhanced by aminolaevulinic acid-mediated photodynamic treatment // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013. Vol. 431, № 3. P. 428-432.
243. *Vredenburgh J.J., Desjardins A., Reardon D.A. Friedman H.S.* Experience with irinotecan for the treatment of malignant glioma // *Neuro-Oncology*. 2009. Vol. 11, № 1. P. 80-91.
244. *Walzlein J.H., Synowitz M., Engels B., Markovic D.S., Gabrusiewicz K., Nikolaev E., Yoshikawa K., Kaminska B., Kempermann G., Uckert W., Kaczmarek L., Kettenmann H., Glass R.* The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age // *Stem Cells*. 2008. Vol. 26, № 11. P. 2945-2954.
245. *Wang Y., Yang J., Zheng H., Tomasek G.J., Zhang P., McKeever P.E., Lee E.Y., Zhu Y.* Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytes glioma in a murine model // *Cancer Cell*. 2009. Vol. 15, № 6. P. 514-526.
246. *Weissman I.L., Anderson D.J., Gage F.* Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001. Vol. 17. P. 387-403.
247. *Weston A., Harris C.C., Holland-Frei.* *Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker, 2003. ID:NBK13982

248. *Wobus A.M., Boheler K.R.* Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy // *Physiological Reviews*. 2005. Vol. 85, № 2. P. 635-678.
249. *Yamanaka R., Homma J., Yajima N., Tsuchiya N., Sano M., Kobayashi T., Yoshida S., Abe T., Narita M., Takahashi M., Tanaka R.* Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial // *Clinical Cancer Research*. 2005. Vol. 11, № 11. P. 4160-4167.
250. *Ye X.Z., Xu S.L., Xin Y.H., Yu S.C., Ping Y.F., Chen L., Xiao H.L., Wang B., Yi L., Wang Q.L., Jiang X.F., Yang L., Zhang P., Qian C., Cui Y.H., Zhang X., Bian X.W.* // *The Journal of Immunology*. 2012. Vol. 189, № 1. P. 444-453.