

УДК: 57.082.15:616-006.484:591.481.1:591.882:616-092.9



Любич Л. Д., Лісяний М. І., Семенова В. М., Стайно Л. П.

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

e-mail: lyubichld@gmail.com

ДИНАМІКА ВМІСТУ CD133⁺ КЛІТИН У КУЛЬТУРАХ ГЛІОМИ С6 ТА ФЕТАЛЬНОГО МОЗКУ ЩУРА ЗА УМОВ ВПЛИВУ СУПЕРНАТАНТУ НЕЙРОГЕННИХ КЛІТИН

РЕЗЮМЕ

Клітинна і молекулярна подібність між стовбуровими клітинами пухлин мозку (СКПГМ) і нормальними нейрогенними стовбуровими клітинами (НСК) обґрунтовує пошук нових методів лікування з використанням НСК при злоякісних гліомах. Молекула CD133 може бути одним з найбільш характерних біомаркерів СКПГМ і розглядатись в якості мішені для таргетної терапії пухлин мозку.

МЕТА: вивчення дії супернатанту нейрогенних клітин (СНК) щура на вміст CD133⁺ клітин у культурах гліоми С6.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Матеріалом для культивування слугували клітини гліоми головного мозку щурів – клітинна лінія С6, для порівняльної оцінки впливу досліджуваного біопрепарату на інтактні нервові клітини використовували клітини фетального мозку щура 14-ї доби гестації (Е14). Дослідження проведені у контрольних культурах за стандартних умов культивування без впливу СНК та на дослідних культурах за умов впливу СНК (0,10 мг/мл по білку) протягом 48 год СНК отримували із суспензій нейрогенних клітин мозку щура (Е14).

РЕЗУЛЬТАТИ. CD133-позитивні клітини становили $12,05 \pm 4,77\%$ від загальної кількості клітин в культурі клітин гліоми С6 і $37,36 \pm 12,33\%$ від усіх клітин в культурі фетального мозку щура. CD133-позитивні клітини мали менші розміри (середні значення площі перерізу клітини, площі перерізу ядра) та більший показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення. Розміри CD133-позитивних клітин та їх ядер у культурах клітин фетального головного мозку щура були вдвічі більші за розміри таких клітин у культурах гліоми С6.

За умов дії СНК протягом 48 год встановлено зменшення кількості CD133-позитивних клітин у культурі клітин гліоми С6 щура ($2,88 \pm 0,41\%$) та відсутність такого впливу у культурі клітин фетального головного мозку щура (Е14).

ВИСНОВКИ. Встановлено морфологічні відмінності CD133-позитивних клітин у культурах гліоми С6 та у культурах клітин фетального головного мозку щура (Е14). Під впливом супернатанту нейрогенних клітин зменшується кількість CD133-позитивних клітин у культурі клітин гліоми С6 у щурів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гліома С6, культура клітин фетального мозку щура, супернатант нейрогенних клітин, CD133

Активні дослідження біологічних властивостей нейрогенних стовбурових клітин (НСК) та відкриття стовбурових клітин пухлин головного мозку (СКПГМ) надали поштовх для переосмислення питання виникнення та прогресування пухлин. Клітинна і молекулярна подібність між СКПГМ і нормальними НСК обґрунтовує пошук нових методів лікування з використанням НСК при злоякісних гліомах.

Встановлено, що пухлини мозку, а саме найбільш злоякісні форми гліом – гліобластоми, містять субпопуляцію СКПГМ або пухлинноініціюючих клітин, що обумовлюють резистентність цих пухлин до

опромінення та хіміотерапії [1, 2]. СКПГМ, як і НСК, мають клоногенні властивості, формують в культурі нейросфери, а при диференціюванні експресують нейрональні та астрогліальні маркери. Припускають, що НСК субвентрикулярної зони є найбільш вірогідним джерелом виникнення гліом в результаті впливу онкогенних вірусів чи канцерогенів [3] та є відповідальними за рецидив хвороби після хірургічної резекції. Як СКПГМ, так і НСК мають здатність до самовідновлення та множинну стійкість до ліків [4,5]. Остання властивість асоціюється з підвищеною експресією та активністю АВС-транспортів,

що є спільними маркерами НСК та СКПГМ. Ще одним спільним маркером є протеїн клітинної поверхні CD133 (промінін-1) [6,7].

Вперше CD133 було виявлено у виступах мембрани нейроепітеліальних стовбурових клітин (СК) миші. Як відомо, молекула CD133 належить до родини глікопротеїнів клітинної поверхні, що мають 5 трансмембранних доменів, і виявляється як в нормальних клітинах, так і в кількох різних типах пухлинних і ракових клітин. В епітеліальних клітинах, особливо нейроепітеліальних СК, молекула CD133 локалізується у мікрворсинках, первинних війках та середній частині тіла клітини, філоподіях та ламеллоподіях апікальної поверхні нейральних епітеліальних клітин [7]. Ці типи поверхневої мембрани клітини піддаються ремоделюванню при епітеліальному та нейроепітеліальному клітинному диференціюванні. CD133 може відігравати ключову роль в організації апікальної плазматичної мембрани в епітеліальних клітинах. Відомо, що надлишкова експресія цього глікопротеїну відбувається при гострому мієлолейкозі, гострому та хронічному лімфолейкозі, мієлодиспластичних синдромах, ретинобластомах, гліобластомах та карциномах нирки. Високі рівні CD133 виявляють також у пухлинах підшлункової залози, шлунку, колоректальних та гепатоцелюлярних раках, пухлинах молочної залози, меланомах, остеосаркомах [1,2]. Вважають, що CD133 може бути одним з найбільш характерних біомаркерів СКПГМ і розглядатись в якості мішені для терапії пухлин мозку [1].

В той же час показано потенціал НСК або нейрогенних прогеніторних клітин (НПК) в якості протипухлинних агентів при розробці генно-клітинної терапії злоякісних гліом мозку завдяки здатності до міграції та вбудовування в патологічні ніші в центральній нервовій системі [8-13]. У попередніх дослідженнях у різних модельних системах нами продемонстровано деякі аспекти протипухлинних властивостей нейрогенних клітин фетального мозку і, зокрема, продуктивних ними гуморальних факторів [14, 15].

Метою даної роботи було вивчення дії супернатанту нейрогенних клітин щура (СНК), як джерела гуморальних факторів, на вміст CD133⁺ клітин у культурах гліоми С6 щура.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для культивування слугували клітини гліоми головного мозку щурів – клітинна лінія С6, надана «Клітинним банком ліній тканин людини та тварин» Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (n = 6). Для порівняльної оцінки впливу досліджуваного біопрепарату на інтактні нервові клітини використовували клітини фетального мозку щура 14-ї доби гестації (E14) (n = 6). Дослідження проведені у наступних групах: 1) контрольні культури – стандартні умови культивування без впливу СНК; 2) дослідні культури – за умов впливу СНК (0,10 мг/мл по білку) протягом 48 год.

Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою», з урахуванням принципів біоетики та норм біологічної безпеки та були погоджені Комітетом з біоетики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Тварин утримували у стандартних умовах віварію, знеболення та евтаназію проводили під ефірним наркозом.

Клітини фетального мозку щура (E14) отримували за протоколом [16]. У дослідженні використані білі щури (n = 6, самиці, вага 200 ± 10 г) розводки віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». У наркотизованих щурів-самиць у зазначений термін вагітності в стерильних умовах вилучали плоди і поміщали в чашки Петрі в середовище DMEM (*Sigma-Aldrich GmbH*, Німеччина). Виділяли тканину головного мозку, промивали у середовищі DMEM, звільняли від судин та оболонки, переносили у свіже

середовище і механічно дисоціювали багатократним піпетуванням. Клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осадку клітин додавали свіже середовище DMEM та ресуспендували. Життєздатність клітин у суспензіях визначали за проникністю плазматичної мембрани для 0,2% розчину трипанового синього (*Merck*, Німеччина) [16].

Для отримання первинних культур клітини гліоми С6 та клітини фетального мозку щурів (E14) в кількості 1•10⁶ наносили на адгезивні покривні скельця, вкриті поліетиленіміном (*Sigma-Aldrich GmbH*, Німеччина), які поміщали у чашки Петрі і культивували в середовищі 199 та DMEM (1:1) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, 400 мг глюкози та 0,2 од/мл інсуліну. Культури клітин тримали в CO₂-інкубаторі (37 °C, 95% вологості та 5% CO₂) та прижиттєво спостерігали в інвертованому мікроскопі Eclips TS 100 (*Nikon*, Японія) з мікрофотографічною реєстрацією.

Супернатант нейрогенних клітин отримували при культивуванні нейрогенних клітин мозку щура, вилучених на 14-у (E14) добу гестації, як описано раніше [14]. Нативну тканину мозку щура звільняли від оболонки у фізіологічному розчині, переносили в середовище DMEM (*Sigma-Aldrich GmbH*, Німеччина) і суспендували багаторазовим піпетуванням. Клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осадку клітин додавали свіже середовище DMEM та ресуспендували. Концентрацію клітин доводили до 6•10⁶/мл, до отриманої клітинної суспензії додавали мітоген конканавалін А (0,1 мг/мл) та інкубували 2 год в CO₂-інкубаторі при температурі 37,0±0,5 °C, постійній вологості 95% та 5% CO₂. Після інкубації клітини осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відмивали у середовищі DMEM, до осадку клітин додавали свіже середовище, ресуспендували та інкубували протягом 24 год. Після інкубації клітини повторно осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 1500 об/хв, відбирали супернатант, визначали у ньому концентрацію білка за методом Лоурі, стандартизували до концентрації 1,0 мг/мл і зберігали при температурі -20 ± 0,5 °C.

Для дослідження впливу СНК на первинні культури відбирали культури з рівномірною зоною росту, додавали СНК (0,10 мг/мл по білку) та інкубували протягом 48 год. Культури фіксували 10% формаліном і проводили цитологічний та імуноцитохімічний аналіз клітинного складу.

Імунофлуоресцентне забарвлення на маркер CD133 проводили з використанням мишачих моноклональних антитіл до CD133 (*Millipore*, США). Для цього зафіксовані на скельцях клітини культури переносили у 0,01 М розчин фосфатного буфера (рН 6,0) на 5 хв. Для блокування неспецифічних реакцій фонового забарвлення скельця з культурами інкубували 10 хв з реагентом Ultra V block (*Thermo Scientific*, США). Після промивання у буфері протягом 5 хв на скельця з культурами наносили мишачі моноклональні антитіла до CD133 (*Millipore*, США) у розведенні 1:100 та інкубували 60 хв при кімнатній температурі. Після відмивання у буфері на скельця з культурами наносили мічені FITC кролячі антитіла до IgG миші (*Сорбент*, Російська Федерація) у розведенні 1:500 та інкубували 20 хв при кімнатній температурі. Після цього промивали дистильованою водою, підсушували і аналізували. Паралельно проводили дослідження з постановкою позитивного і негативного контролю.

Мікроскопічне дослідження та фотореєстрацію цитологічних препаратів первинних культур здійснювали на мікроскопі Axiomager A2 (*Carl Zeiss Microscopy GmbH*, Німеччина) з широкосмуговим фільтром та фотокамерою AxioCam MRc5 (*Carl Zeiss*, Німеччина). Кількісні дослідження контрольних та дослідних культур проводили в 10 репрезентативних полях зору зі стандартною вимірною шкалою об'єкт-мікромметра. Аналіз цифрових зображень проводили за допомогою програмного забезпечення *Zen Lite 2012* (Німеччина). У препаратах культур визначали загальну кількість клітин, кількість CD133-позитивних/негативних клітин, морфометричні показники.

Морфометричний аналіз проводили за допомогою обробки цифрових зображень культур в 10 довільно вибраних полях зору площею

0,04 мм² для кожного зразка при однаковому збільшенні (x 800). Визначали: кількість клітин на 0,04 мм² зразка культури; площу перерізу ядер клітин на 0,04 мм² зразка культури; площу перерізу цитоплазми клітин на 0,04 мм² зразка культури; довжину відростків. Кількісний показник ядерно-цитоплазматичного співвідношення знаходили як частку математичного ділення площі перерізу ядер клітин на площу перерізу цитоплазми клітин.

Кількість CD133-позитивних та негативних клітин визначали в 10 довільно вибраних полях зору для кожного зразка при однаковому збільшенні (x 800) та вираховували як частку від загальної кількості клітин у %.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету статистичних програм *Statistica 6.0*, програмне забезпечення *StatSoft, Inc.* (2003). Застосовували параметричні (t-критерій Стьюдента, двох-вибірковий t-тест з різними дисперсіями) та непараметричні (критерій Манна-Уїтні для порівняння незалежних груп) методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$, статистично високозначущими – при $p < 0,01$.

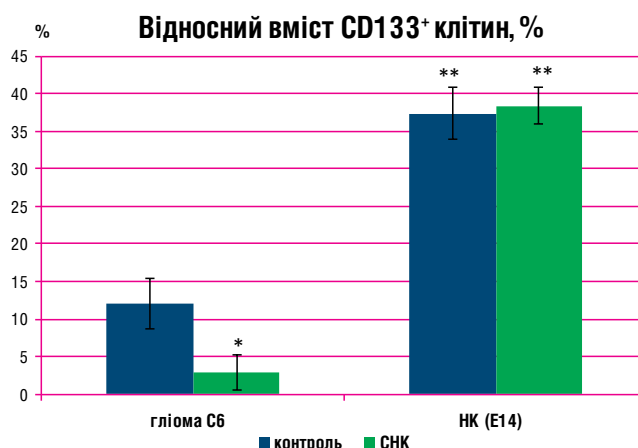
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для дослідження впливу СНК відбирали культури клітин з рівномірною зоною росту на 7-10-у добу. У контрольних культурах гліоми С6 визначались пухлинні клітини астроцитарного фенотипу уніполярної, трикутної або ромбоподібної форми з відростками (середньої довжини $91,39 \pm 11,91$ мкм), які формували ретикулярну структуру (рис. 1 А).

Пухлинні клітини, позитивні на CD133, становили $12,05 \pm 4,77\%$ від загальної кількості клітин в культурі (рис. 2), що в цілому узгоджується з відомими даними літератури [1].

CD133-позитивні пухлинні клітини гліоми С6 відзначались значно меншим розміром, порівняно з негативними клітинами – їх морфометричні показники статистично відрізнялись. Зокрема, середні значення площі перерізу CD133-негативних та позитивних клітин склали відповідно $1284,23 \pm 199,66$ мкм² та $222,43 \pm 23,91$ мкм² ($p < 0,01$, рис. 3 А); середні значення площі перерізу ядра CD133-негативних клітин $193,35 \pm 30,88$ мкм² перевищували відповідні

Рис. 2. Відносний вміст CD133⁺ клітин у культурах за умов впливу СНК (0,1 мг/мл, 48 год).



Примітки:

* Статистично значущі відмінності в порівнянні з відповідним контролем, $p < 0,05$;

** Статистично значущі відмінності в порівнянні з відповідною культурою клітин гліоми С6, $p < 0,01$.

значення позитивних клітин ($52,97 \pm 6,87$ мкм², $p < 0,01$, рис. 3 Б); ядерно-цитоплазматичне співвідношення у CD133-позитивних клітинах $0,51 \pm 0,10$ перевищувало показник у CD133-негативних клітинах ($0,18 \pm 0,02$, $p < 0,01$, рис. 3 В).

У контрольних культурах інтактних клітин фетального головного мозку щура (Е14) формувались сіткоподібні структури з відростчатих гліальних клітин, серед яких визначались клітини нейробластного фенотипу (рис. 1 В). Середня довжина відростків складала $69,24 \pm 32,24$ мкм. Клітини, позитивні на CD133, становили $37,36 \pm 12,33\%$ від загальної кількості клітин в культурі, що суттєво перевищувало кількість позитивних клітин у культурі гліоми С6 ($p < 0,01$, рис. 2). В той же час, морфометричні показники CD133-позитивних клітин у культурі клітин фетального головного мозку щура (Е14), як і в культурі клітин гліоми С6, статистично відрізнялись від показників CD133-негативних клітин. Так, середні значення площі перерізу CD133-негативних та позитивних клітин склали відповідно

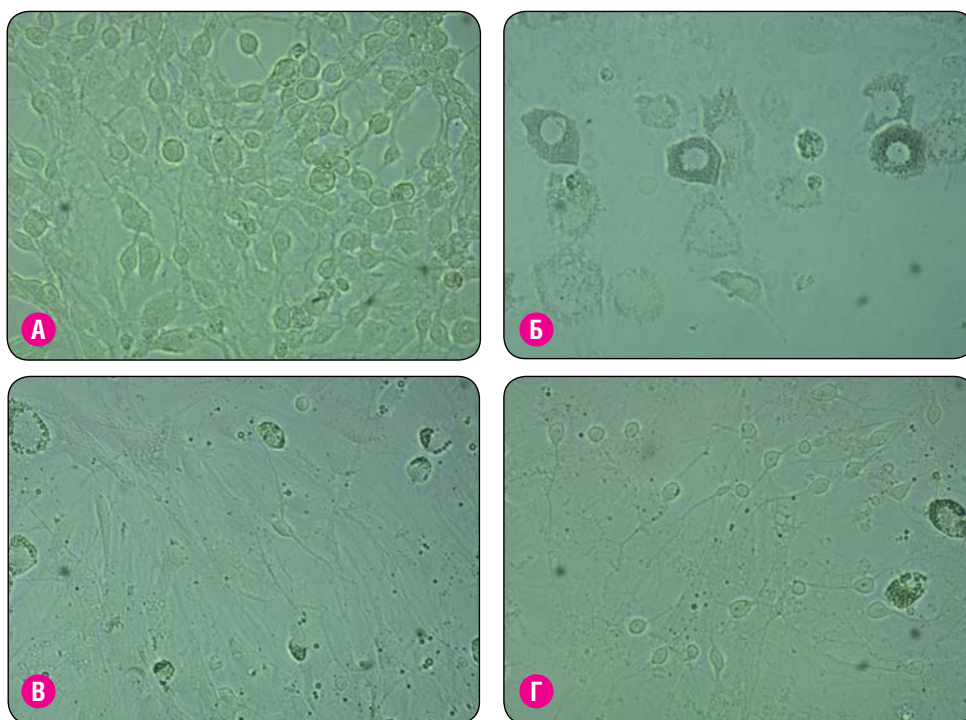


Рис. 1. Мікрофотографії первинних культур гліоми С6 та фетального мозку щура. Морфологічні зміни за умов впливу супернатанту фетальних нейрогенних клітин (СНК). Світлова мікроскопія, x 800.

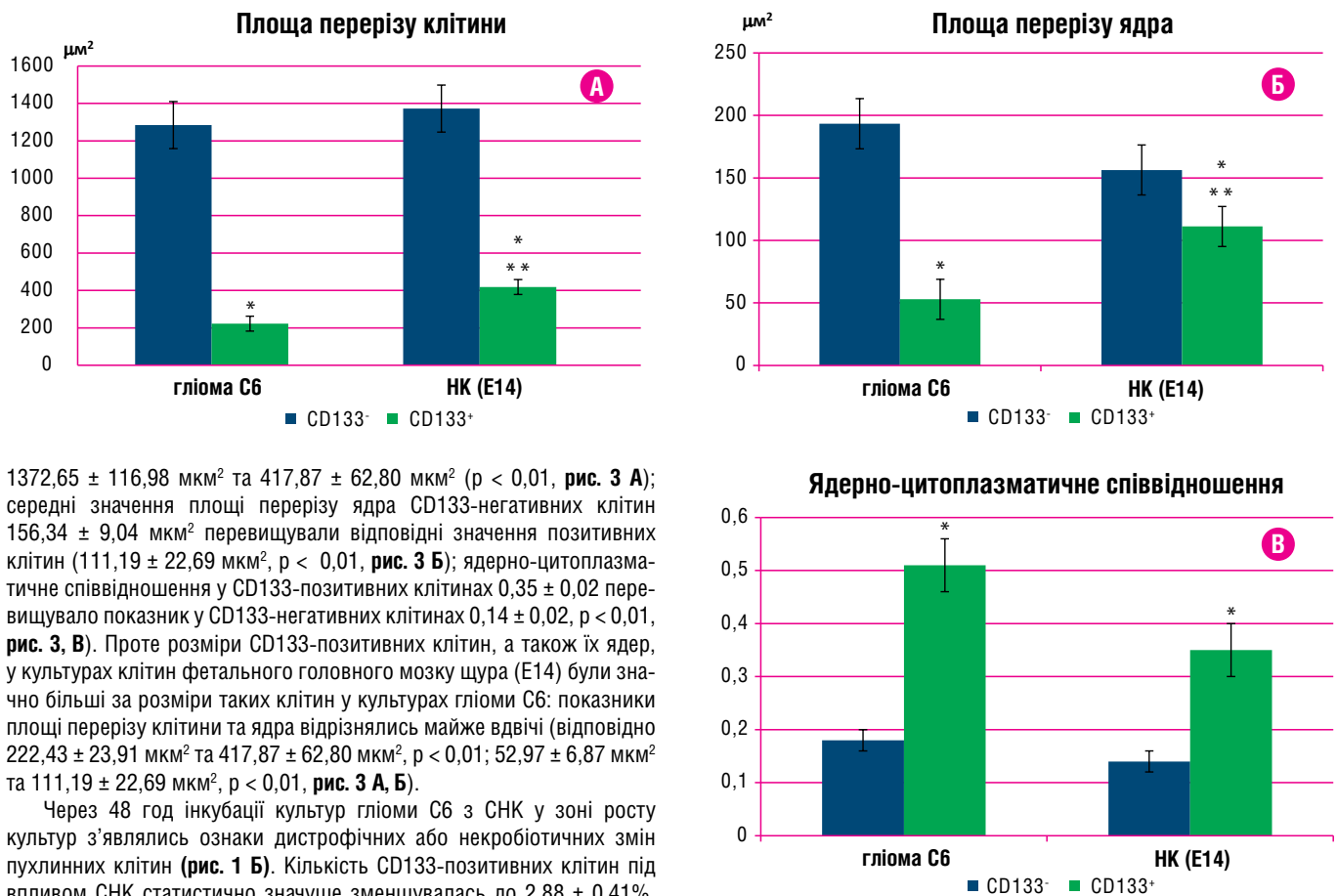
А – культура гліоми С6, 7-а доба, контроль.

Б – культура гліоми С6, інкубація з СНК (Е14), 0,10 мг/мл, 48 год.

В – культура фетального мозку щура (Е14), 10-а доба, контроль.

Г – культура фетального мозку щура (Е14), інкубація з СНК (Е14), 0,10 мг/мл, 48 год.

Рис. 3. Морфологічні характеристики культивованих клітин в залежності від експресії CD133.



1372,65 ± 116,98 мкм² та 417,87 ± 62,80 мкм² ($p < 0,01$, рис. 3 А); середні значення площі перерізу ядра CD133-негативних клітин 156,34 ± 9,04 мкм² перевищували відповідні значення позитивних клітин (111,19 ± 22,69 мкм², $p < 0,01$, рис. 3 Б); ядерно-цитоплазматичне співвідношення у CD133-позитивних клітинах 0,35 ± 0,02 перевищувало показник у CD133-негативних клітинах 0,14 ± 0,02, $p < 0,01$, рис. 3, В). Проте розміри CD133-позитивних клітин, а також їх ядер, у культурах клітин фетального головного мозку щура (E14) були значно більші за розміри таких клітин у культурах гліоми С6: показники площі перерізу клітини та ядра відрізнялись майже вдвічі (відповідно 222,43 ± 23,91 мкм² та 417,87 ± 62,80 мкм², $p < 0,01$; 52,97 ± 6,87 мкм² та 111,19 ± 22,69 мкм², $p < 0,01$, рис. 3 А, Б).

Через 48 год інкубації культур гліоми С6 з СНК у зоні росту культур з'являлись ознаки дистрофічних або некробіотичних змін пухлинних клітин (рис. 1 Б). Кількість CD133-позитивних клітин під впливом СНК статистично значуще зменшувалась до 2,88 ± 0,41%, $p < 0,05$, у порівнянні з контролем (рис. 2; рис. 4 А, Б).

На протипагу, після інкубації з СНК у структурі зони росту і клітинному складі культур клітин фетального головного мозку щура (E14), порівняно з контрольними спостереженнями, суттєвих відмінностей не виявлено (рис. 1 Г), що може свідчити про відсутність

Примітки:

* Статистично значущі відмінності в порівнянні з CD133-негативними клітинами, $p < 0,01$;

** Статистично значущі відмінності в порівнянні з відповідною групою клітин гліоми С6, $p < 0,01$.

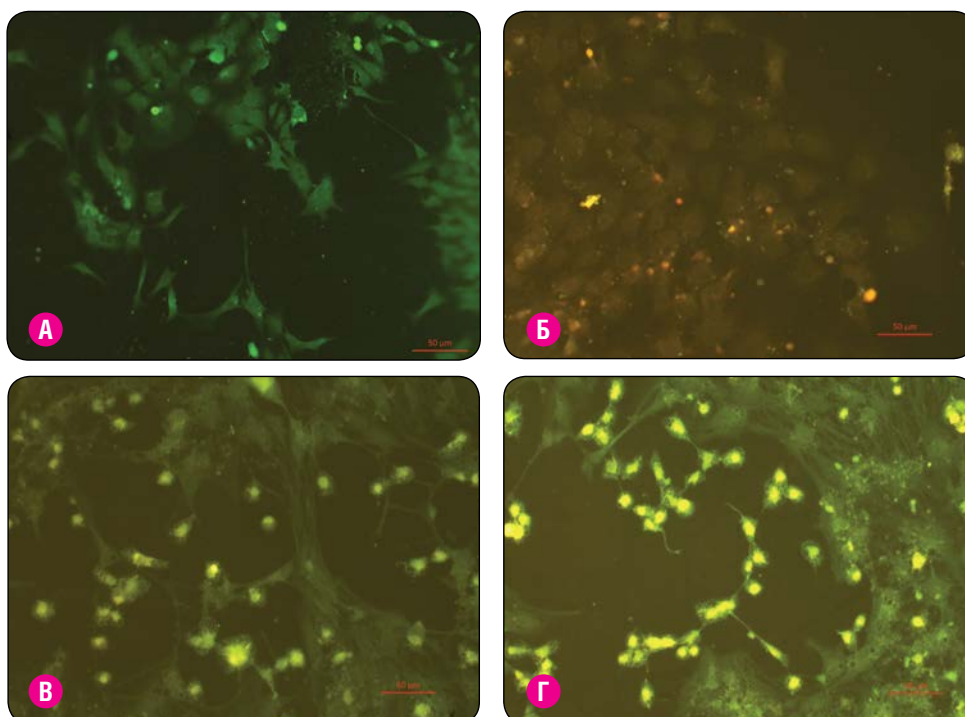


Рис. 4. Мікрофотографії культур клітин гліоми С6 та фетального мозку щура. Морфологічні зміни за умов впливу супернатанту фетальних нейрогенних клітин (СНК). Імунофлуоресцентне забарвлення на CD133 (зелений колір). Люмінесцентна мікроскопія.

А – культура гліоми С6, контроль;

Б – культура гліоми С6, інкубація з СНК (E14), 0,10 мг/мл, 48 год;

В – культура клітин фетального мозку, контроль;

Г – культура клітин фетального мозку, інкубація з СНК (E14), 0,10 мг/мл, 48 год.

значущого впливу СНК на інтактні нервові клітини головного мозку. Кількість CD133-позитивних клітин під впливом СНК практично не змінювалась: $38,89 \pm 7,08 \%$, ($p = 0,209$ у порівнянні з контролем) (рис. 2, рис. 4 В, Г).

Таким чином, результати дослідження впливу СНК протягом 48 год на культивовані клітини гліоми C6 доводять зменшення вмісту CD133-експресуючих клітин, тобто СКПГМ у культурі пухлинних клітин. Оскільки такого ефекту на CD133-експресуючі клітини в культурі фетального головного мозку щура нами не виявлено, але встановлено вдвічі менший розмір CD133-позитивних клітин у культурах гліоми C6, порівняно з CD133-позитивними клітинами фетального мозку, можна припустити, що СКПГМ гліоми C6 мають якісні відмінності від НСК (ймовірно, експресують ліганди для активних молекулярних агентів, що входять до складу СНК).

У зв'язку з цим, на нашу думку, слід навести дані дослідження Chen et al. (2010) [17], які продемонстрували існування в тканині гліоми одночасно трьох різних типів СКПГМ, що відрізнялись за експресією CD133:

- 1) CD133-негативні клітини, здатні генерувати CD133-позитивні прогенітори;
- 2) CD133-позитивні клітини, здатні генерувати CD133-негативні клітини;
- 3) CD133-негативні клітини, що генерують тільки CD133-негативні прогенітори.

Тому деякі автори дещо критично ставляться до ролі CD133 як маркера СК через нез'ясовані його біологічні функції [2]. Слід зазначити, що на сьогодні невідомі конкретні ліганди чи зв'язки молекули CD133 з сигнальними клітинними шляхами. За даними Angelastro J. M. та Lame

M. W. (2010), екзогенна експресія CD133 викликала зниження апоптозу пухлинних клітин у 2-4 рази у відповідь на такі терапевтичні агенти, як каптотецин та доксорубіцин, а CD133⁺ клітини гліоми C6 мали підвищену на 62% експресію одного з АВС-транспортів (Р-глікопротеїн), що призводило до медикаментозної резистентності. Автори підтримують гіпотезу про антиапоптотичну функціональну роль CD133 у захисті пухлинних клітин, зокрема від хіміотерапевтичних агентів.

За даними наших попередніх досліджень, СНК щура у своєму складі містить дві основні переважаючі фракції білків: 67 кДа – 55%; 46 кДа – 44%; а також мінорні фракції з невеликими кількостями BDNF, TGF- β 1, IL-1 β та IL-4 [15]. Це узгоджується з відомими даними про те, що мультипотентні НПК людини, щура і миші можуть експресувати як прозапальні, так і супресорні цитокини (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, TNF- α , LIF) [18-20]. На нашу думку, можна припустити, що зменшення кількості CD133-експресуючих клітин у культурі клітин гліоми C6 за умов впливу СНК спричинене відповідними властивостями дії TGF- β 1 (регуляція проліферації, диференціації та виживання або апоптозу клітин) [21-23] та, можливо, BDNF (зв'язування з рецепторами суперродини фактора некрозу пухлин, що активує внутрішньоклітинні сигнальні каскади NF- κ B, J μ n-кінази, які опосередковують ініціацію апоптозу [24]).

Механізм впливу СНК на експресію CD133 у клітинах гліоми C6 потребує подальшого поглибленого вивчення. Оскільки CD133 розглядають в якості критичної терапевтичної мішені для таргетної терапії пухлин мозку, отримані результати можуть стати основою для комплексного дослідження препаратів з фетальних нейрогенних клітин з метою теоретичного обґрунтування їх застосування у патогенетичному лікуванні хворих з гліомами.

ВИСНОВКИ

Отже, CD133-позитивні клітини у культурах гліоми C6 мали вдвічі менші розміри, ніж CD133-позитивні клітини у культурах клітин фетального головного мозку щура (E14). За умов дії СНК у концентрації 0,10 мг/мл протягом 48 год встановлено зменшення кількості CD133-позитивних клітин у культурі клітин гліоми C6 щура та відсутність такого впливу у культурі клітин фетального головного мозку щура (E14).

Таким чином, встановлено морфологічні відмінності CD133-позитивних клітин у культурах гліоми C6 та у культурах клітин фетального головного мозку щура (E14) і продемонстровано, що під впливом супернатанту нейрогенних клітин зменшується кількість CD133-позитивних клітин у культурі клітин гліоми C6 у щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Angelastro J. M. Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells [Text] / J. M. Angelastro, M. W. Lame // Mol. Cancer Res. – 2010. – Vol. 8, № 8. – P. 1105–1115.
2. Brescia P. Current strategies for identification of glioma stem cells: Adequate or unsatisfactory? [Text] / P. Brescia, Ch. Richichi, G. Pehcci // J. Oncol. – 2012. – e37689. – Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3366252/pdf/JO2012-376894.pdf>
3. Sanai N. Neural stem cells and the origin of gliomas [Text] / N. Sanai, A. Alvarez-Buylla, M. S. Berger // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353, № 8. – P. 811–822.
4. Shervington A. Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells [Text] / A. Shervington, C. Lu // Cancer Invest. – 2008. – Vol. 26, № 5. – P. 535–542.
5. Identification of cancer stem-like cells in C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods [Text] / G. Shen, F. Shen, Z. Shi, et al. // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. – 2008. – Vol. 44, № 7. – P. 280–289.
6. Cancer stem cells and brain tumors [Text] / A. Perez Castillo, D. Aguilar-Morante, J. A. Morales-Garcia, et al. // Clin. Transl. Oncol. – 2008. – Vol. 10, № 5. – P. 262–267.
7. Mizrak D. CD133 molecule of the moment [Text] / D. Mizrak, M. Brittan, M. R. Alison // J. Pathol. – 2008. – Vol. 214, № 1. – P. 3–9.
8. Maintaining and loading neural stem cells for delivery of oncolytic adenovirus to brain tumors [Text] / A. U. Ahmed, I. V. Ulasov, R. W. Mercer, et al. // Methods Mol. Biol. – 2012. – Vol. 797. – P. 97–109.
9. Contact and encirclement of glioma cells in vitro is an intrinsic behavior of a clonal human neural stem cell line [Text] // N. Khosh, C. E. Brown, K. S. Aboody, et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 12. – e51859. – Available: <http://www.journal.plosone.org/paper/3003453>
10. Neural Stem Cell–Mediated Enzyme/Prodrug Therapy for Glioma: Preclinical Studies [Text] / K. S. Aboody, J. Najbauer, M. Z. Metz, et al. // Sci. Transl. Med. – 2013. – Vol. 5, № 184. – P. 184–189.
11. Bovenberg M. S. Advances in stem cell therapy against gliomas [Text] / M. S. Bovenberg, M. H. Degeling, B. A. Tannous // Trends Mol. Med. – 2013. – Vol. 19, № 5. – P. 281–291.
12. Analysis of glioblastoma tumor coverage by oncolytic virus-loaded neural stem cells using MRI-based tracking and histological reconstruction [Text] / R. A. Morshed, M. Gutova, J. Juliano, et al. // Cancer Gene Therapy. – 2015. – Vol. 22. – P. 55–61.

13. Stem cell therapeutics for cancer [Text] / *Shah Kh.(ed.)*. // Wiley Blackwell, 2013. – 304 p.
14. Любич Л. Д. Дослідження впливу супернатанту нейрогенних клітин на пухлиноіндукуючу здатність клітин гліоми 101.8 у щурів [Текст] // Л. Д. Любич, М. І. Лісяний // Клітинна та органна трансплантологія. – 2015. – Т. 3, № 1. – С. 52-61.
15. *Liubich L. D.* Influence of rat progenitor neurogenic cells supernatant on glioma 101.8 cells in vitro [Text] / *L. D. Liubich, V. M. Semenova, L. P. Stayno* // Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31, № 3. – P. 200–208.
16. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы [Текст] / *В. П. Божкова, П. Д. Брежестовский, В. П. Буравлев и др.* // М.: Наука, 1988. – 317 с.
17. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma [Text] / *R. Chen, M. C. Nishimura, S. M. Bumbaca, et al.* // Cancer Cell. – 2010. – Vol. 17, № 4. – P. 362–375.
18. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells [Text] / *H. J. Klassen, K. L. Imfeld, I. I. Kirov, et al.* // Cytokine. – 2003. – Vol. 22, № 3-4. – P. 101-106.
19. Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials in vitro [Text] / *J. Liu, C. Götherström, M. Forsberg, et al.* // Stem Cell Res. – 2013. – Vol. 10, № 3. – P. 325-337.
20. Neural stem cells secrete factors that promote auditory cell proliferation via a leukemia inhibitory factor signaling pathway [Text] / *H. C. Chen, H. I. Ma, H. K. Sytwu, et al.* // J. Neurosci. Res. – 2010. – Vol. 88, № 15. – P. 3308-3318.
21. *Kaminska B.* TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis [Text] / *B. Kaminska, M. Kocyk, M. Kijewska* // Adv.Exp.Med.Biol. – 2013. – Vol. 986. – P. 171-187.
22. Correlation between TSP-1, TGF- β and PPAR- γ expression levels and glioma microvascular density [Text] / *J. Zhang, W. Yang, D. Zhao, et al.* // Oncol. Lett. – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 95-100.
23. *Dubrovskaya A.M.* Low-density microarray analysis of TGF β 1-dependent cell cycle regulation in human breast adenocarcinoma MCG7 cell line [Text] / *A. M. Dubrovskaya, S. S. Souchelnytskyi* // Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30, № 2. – P. 107-117.
24. *Binder D. K.* Brain-derived Neurotrophic Factor [Text] / *D. K. Binder, H. E. Scharfman* // Growth Factors. – 2004. – Vol. 22, № 3. – P. 123-131.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 01.10.2015 р.

Прийнята до друку 23.11.2015 р.