

УДК 616.831-006.484.04:576.3/4:576.8.083.1



Семенова В. М., Лисяный Н. И., Розуменко В. Д., Егорова Д. М., Стайно Л. П.

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова НАМН Украины», Киев, Украина

e-mail: seveme22@rambler.ru

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ (обзор литературы)

РЕЗЮМЕ

В обзоре представлены современные данные о биологических свойствах опухолевых стволовых клеток в глиомах головного мозга. Показаны возможности использования метода культивирования клеток и иммуногистохимической идентификации опухолевых стволовых клеток в составе нейросфер (туморосфер), описаны методические особенности культивирования нейросфер.

Представлены данные литературы о зависимости активности нейросферообразования в культуре от степени анаплазии исходных тканей глиом с учетом клинических исходов заболевания у нейроонкологических больных. Описаны возможности практического использования культивируемых туморосфер в изучении избирательного воздействия антибластических препаратов на опухолевые стволовые клетки глиом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухолевые стволовые клетки, глиомы головного мозга, культура клеток, нейросферы

К настоящему времени накоплено большое количество данных, предполагающих, что злокачественные глиальные опухоли головного мозга подобно нормальной нервной ткани формируют клеточную иерархию из недифференцированных клеток-прогениторов [1]. В литературе эта популяция самообновляющихся клеток с опухоленными свойствами определяется как опухолевые стволовые клетки (ОСК), обладающие большим сходством с нейральными стволовыми клетками (НСК) нейрогенераторных зон нормального мозга [2, 3]. Подобно НСК опухолевые стволовые клетки глиом способны к самовоспроизведению и экспрессируют маркеры первичных нейронов и глиоцитов – астроцитов и олигодендроцитов [4–6]. Однако, в отличие от нормальных НСК, ОСК функционируют нерегулируемым образом и вызывают продолженный рост опухоли после ее первичной резекции.

Считается, что ОСК являются важным звеном в инициации, поддержании и прогрессировании первичного и продолженного роста частично удаленных глиом головного мозга, хотя значение опухолевого микроокружения не менее важно в этих процессах. При этом содержание ОСК в ткани глиом нарастает пропорционально повышению степени их злокачественности с параллельным увеличением уровней экспрессии иммуноцитохимических маркеров их стволовых свойств [4, 7–9]. Общеизвестно, что выявление ОСК в различных типах опухолей, а также в глиомах головного мозга, связано с неблагоприятным прогнозом заболевания [10–14].

Использование принципов, принятых в исследованиях нормальных НСК, к изучению популяции ОСК в опухолях головного мозга устанавливает связь между нормальным нейрогенезом в мозге и туморогенезом. При этом идентификация ОСК в ткани головного мозга обеспечивает мощный инструмент для изучения процесса туморогенности в ЦНС, а также для разработки оптимизированных методов лечения глиом, направленных на уничтожение ОСК. Наличие популяции ОСК в ткани злокачественных глиом обуславливает их клеточную гетерогенность, поскольку они имеют неопределенно изменчивый срок жизнеспособности и репродукции, накапливают со временем различные мутации и вызывают развитие резистентности глиом к адьювантной терапии [2, 15–18].

Идентификация ОСК в клетках злокачественных глиом определяется, в первую очередь, иммуноцитохимическим выявлением экспрессии нестина – маркера НСК [19, 20]. В то же время, по мнению Singh S. K. с соавт. [21], наличие экспрессии CD133 в ОСК злокачественных глиом является достаточным и необходимым условием для инициации роста опухоли после трансплантации ОСК в мозг иммунодефицитных мышей.

Показано также, что экспрессия генов эмбриональных стволовых клеток в ОСК глиобластом поясняет их агрессивную биологию [22]. По данным K. Mishima с соавт. [23], D. R. Larks с соавт. [24], R. H. Dahlrot с соавт. [25], экспрессия в ОСК злокачественных глиом

стволовых маркеров – подопланина (PDPN), CD133 и нестина – может служить прогностическими факторами клинических исходов. В то же время рядом авторов признаки экспрессии стволовых маркеров в ОСК не признаются прогностически значимыми [26-28].

Таким образом, уточненная идентификация и клеточный генез ОСК в глиомах головного мозга до сих пор остаются полностью невыясненными. Углубленное изучение биологии ОСК в глиомах головного мозга представляет важное направление иммуноцитохимических и молекулярно-генетических исследований этих опухолей на современном этапе.

Важная роль в этих исследованиях принадлежит экспериментальному методу культивирования клеток, который позволяет выделять из ткани исходной опухоли популяцию ОСК в составе нейросфер и отслеживать прижизненную динамику их роста. Как отмечают D. R. Larks с соавт. [24], возобновляемое формирование нейросфер (туморосфер) в культуре является фундаментальным свойством ОСК и определяющим фактором, инициирующим рост опухолей в ткани головного мозга. Принадлежность культивируемых клеток к ОСК доказывается на основании следующих критериев: а) генерация кластеров клональных производных, формирующих нейросферы в культуре; б) самообновление и пролиферация опухолевых клеток; в) дифференцировка с воспроизведением фенотипа клеток исходной опухоли; г) экспрессия иммуноцитохимических маркеров ОСК в нейросфероподобных клеточных кластерах культуры.

Учитывая высокую информативность феномена нейросферообразования НСК и ОСК в условиях культивирования, в исследованиях последних лет большое внимание уделяется разработке и усовершенствованию способов получения нейросфер из опухолевой ткани глиом с дифференцированной идентификацией их клеточного состава.

Существенное влияние на эффективность и динамику нейросферообразования культивируемых ОСК оказывает первоначальная плотность посева опухолевых клеток. Так, при низкой клеточной плотности посева из образующихся микроагрегатов НСК в бессывороточной среде с наличием ростовых факторов в процессе культивирования образуются неадгезивные колониальные клеточные скопления, названные нейросферами [29]. Позже было показано, что клетки, изолированные из детских опухолей мозга и глиобластом, при низкой клеточной плотности посева в бессывороточных средах также способны формировать нейросферы с высокой способностью к пролиферации и самообновлению, а также могут проявлять тенденции к мультилинейной дифференцировке в нейрональные и глиальные линии с образованием некоторого количества аномальных клеток со смешанным фенотипом [16].

При высокой плотности посева нейросферы могут агрегировать и слипаться между собой [30]. Поэтому количественный показатель нейросферообразования в культуре следует считать достоверным лишь при первоначально низкой плотности посева опухолевых клеток ($< 1 \cdot 10^5$ клеток/см²) [31]. Несмотря на эти ограничения, метод культивирования нейросфер считается высокоинформативным способом изучения биологии ОСК злокачественных глиом.

Нейросферы представляют собой гетерогенные агрегаты, происходящие от ранней прогениторной клетки или одной ОСК. При диссоциации нейросфер клетки таких культур пригодны к серийному плейтингу, в котором часть клеток формирует вторичные или третичные нейросферы на протяжении многих пассажей. На моделях интрацеребральной трансплантации ксенографтов таких нейросфер доказано формирование инвазивных опухолей [21].

В опытах Qiang L. с соавт. [32] установлено, что обработка сывороткой нейросфер, полученных в культуре глиобластом, ведет к астроглиальной дифференцировке части клеток. С другой стороны, обнаружено, что некоторые адгезивные линии глиобластом, полученные на средах с содержанием сыворотки, также могут образовывать нейросферы.

Gilbert C. A. с соавт. [33] традиционно выращивали в адгезивной культуре клеточки глиобластом в присутствии сыворотки, при

этом большинство формирующихся нейросфер проявляли опухолевые свойства. Однако часть этих культур, в отличие от исходных опухолей пациентов с глиобластомами, не обладали инвазивными свойствами опухолевого роста при трансплантации в мозг иммунодефицитных мышей. При этом культивируемые клетки нейросфер экспрессировали высокие уровни иммуноцитохимических маркеров дифференцировки, поэтому такие культуры, по мнению авторов, оказались непригодными для изучения биологии ОСК.

Клетки нейросфер, полученные при культивировании глиальных опухолей мозга в сывороточных средах, экспрессируют такие гены НСК, как Musashi-1 (Msi-1), Sox2 и Vmi-1 [34]. Однако в бессывороточных питательных средах клетки нейросфер воспроизводят профиль генной экспрессии исходной опухоли более точно, нежели в культурах с содержанием сыворотки [8].

Таким образом, ключевым фактором в системе культивирования нейросфер является использование бессывороточных сред определенного состава, что обеспечивает рост ОСК в составе нейросфер, поскольку лишь в этих условиях ОСК воспроизводят популяцию клеток с НСК-связанными генами и имеют меньше генетических альтераций [33].

Важно отметить, что при культивировании ряда экспериментальных глиальных клеточных линий индивидуальная вариабельность выхода ОСК в разных линиях колебалась в пределах 1-30%, что связано с их различной способностью формировать нейросферы. В этих экспериментах оказалось также, что большинство клеток в нейросферах относятся к более дифференцированным транзиторно-амплифицированным клеткам [35].

По наблюдениям Lee J. C. с соавт. [8] активность нейросферообразования и морфология нейросфер в бессывороточных питательных средах меняются со временем на протяжении 4 мес культивирования. Gilbert C. A. с соавт. [33] наблюдали видоизменение структуры нейросфер на протяжении более 20 пассажей от плотных кластеров с почти индивидуально неразличимыми клетками до более рыхлых клеточных скоплений.

По общему мнению, на воспроизводимость нейросферообразования ОСК глиом в условиях культивирования оказывает влияние также время проведения диссоциации нейросфер. Так, при более ранней диссоциации нейросфер процент нейросферо-иницирующих клеток увеличивается, а при более поздней диссоциации нейросфер повышается вероятность клеточной гибели.

Среди методических приемов, влияющих на эффективность нейросферообразования ОСК, большое значение придается также способам диссоциации нейросфер. Для получения суспензии отдельных клеток наиболее часто используется механическая диссоциация нейросфер при помощи пипетирования. Наряду с этим применяется также ферментативная диссоциация нейросфер с помощью ряда ферментов. Однако использование, к примеру, протеаз может вызывать повреждение поверхностных клеточных мембран и маркеров, в частности CD133, что приводит к недооценке количества ОСК в клеточной суспензии и неэффективной их сортировке. Тем не менее ряд лабораторий успешно получают культуры нейросфер из глиобластом, используя ферментативную диссоциацию ткани опухоли и культивирование клеток в бессывороточной среде с добавлением ростовых факторов [8, 24, 36-39].

Метод pH-диссоциации нейросфер является менее жестким по отношению к клеткам, чем традиционная механическая диссоциация, и не влияет на свойства ОСК в культуре. Так, Gilbert C. A. с соавт. [33] применили кратковременную диссоциацию нейросфер в сильно щелочной среде при мягком пипетировании и благодаря этому обеспечили эффективное поддержание опухолевых нейросфер в первичных культурах на протяжении многих пассажей.

Изучение структуры нейросфер представляет определенные трудности. Так, наличие дифференцированных клеточных потомков и возникновение некрозов в нейросферах, образующихся в результате плотной клеточной упаковки, угнетает диффузию ростовых факторов к большинству клеток [40].

S. Facchino с соавт. [41] показали, что очищенные CD133⁺ клетки глиобластом головного мозга образуют нейросферы в культуре, а в присутствии индукторов дифференцировки могут дифференцироваться в глиальные клетки и нейроны. По мнению авторов, CD133⁺ клетки, выделенные из глиобластом, могут индуцировать очень агрессивные опухоли при трансплантации в мозг мышей в эксперименте *in vivo*. Такие опухоли резистентны к химио- и радиотерапии и именно они ответственны за развитие опухоли и ее продолженный рост после традиционного лечения этих пациентов с глиобластомами.

Yi L. с соавт. [42] обнаружили, что нейросферы, полученные при культивировании из первичной глиобластомы человека, а также из мышечной клеточной линии глиобластом (GL261-NS), при введении в мозг сингенных мышей продемонстрировали повышенную туморогенность, образуя злокачественные глиомы в мозге этих животных.

Показано также, что опухолевые клетки, полученные из образцов человеческих глиом, могут расти и как адгезивные культуры на обработанных ламинином субстратах в бессывороточной среде для культивирования нейросфер. Преимуществом адгезивных культур является одинаково эффективный доступ всех клеток монослоя к ростовым факторам, препятствующим дифференцировке и апоптозу. В адгезивных культурах глиом ОСК менее гетерогенны в сравнении с культурой нейросфер и почти все клетки экспрессируют маркеры ОСК – Sox2, nestin, CD133 и CD44. Лишь некоторые из этих клеток экспрессируют маркеры дифференцировки. При внутримозговой инъекции иммунокомпетентным мышам лишь 100 клеток из адгезивных культур формировались инвазивные опухоли мозга. В связи с этим считается, что адгезивные культуры ОСК представляют превосходную систему для скрининга эффективности лекарств, т. к. они способны продуцировать адгезивные клеточные линии из всех оцениваемых глиом с хорошей клеточной жизнеспособностью [6].

Ravon L. F. с соавт. [43] разработали оптимальный метод получения нейросфер из первичной культуры глиобластом человека с последующим отбором CD133⁺ клеток, которые формировали субсферы из CD133⁺ субпопуляции. В клетках субсфер были идентифицированы маркеры GFAP, CD133, nestin, Nanog, CD34, Sox2, CD44 и CD90. Авторы установили, что нейросферы, полученные из первичной культуры глиобластом, содержат на 29% больше клеток, экспрессирующих CD133 в сравнении с клетками из нативной опухоли. Это означает более высокую концентрацию CD133⁺ клеток в нейросферах, образующихся именно в первичной культуре глиобластом, в которых около 89% клеток экспрессируют CD133 против 60% CD133⁺ клеток, полученных из нативной опухоли.

В работе Li S. C. с соавт. [44] рассмотрен вопрос о признаках идентичности и отличий ОСК и НСК из нейрорегенераторных регионов субвентрикулярных и гиппокампальных зон головного мозга. При анализе взаимосвязи между ОСК и нормальными НСК особое внимание уделено маркеру НСК CD133, который с большим постоянством выявляется в клетках глиом головного мозга, особенно в глиобластомах. Авторы выявили высокий уровень его экспрессии в ткани исследованных глиом, а также в клеточных линиях глиомы U251 и U87MG. Однако остается неясным, происходят ли CD133⁺ ОСК от CD133⁺ нормальных НСК [32]. В связи с этим в литературе активно обсуждается вопрос о разработке противоопухолевой терапии, направленной на разрушение именно опухолевых CD133⁺ стволовых клеток без повреждения нормальных НСК.

Li S. C. с соавт. [44] удалось изолировать ОСК из ткани редкого типа глиобластом человека, поражающей нейрорегенераторную зону стенки бокового желудочка головного мозга. Микроскопически эта глиобластома имела характерную гистоструктуру с выраженным клеточным полиморфизмом, высокой митотической активностью и некротическими очагами различной протяженности. Выделенные из ткани этой глиобластомы CD133⁺ клетки экспрессируют также маркеры ОСК: нестин, CD133, Ki67, Sox2, EFNБ1, EFNБ2, EFNБ3, Cav-1, Musashi, Nucleostemin, Notch2, Notch4, Pax6. В бессывороточных культурах с наличием факторов роста EGF и bFGF CD133⁺ клетки

формировали нейросферы. Стволовые свойства этих клеток подтверждены развитием злокачественной глиомы в мозге иммунодефицитных мышей NOD/SCID после стереотаксической внутримозговой трансплантации.

По наблюдениям авторов, ОСК рецидивирующей глиобластомы того же пациента показали более высокую, чем в первичной опухоли, экспрессию CD133 как в нативной ткани, так и в культуре. Выделенные из этой глиобластомы CD133⁺ опухолевые клетки пролиферировали в условиях мягкого агара с образованием колоний разных размеров. Отмечено также, что CD133⁺ клетки прилипали к фибронектину в питательной среде с наличием сыворотки и распластывались с образованием нейритоподобных отростков, отражающих проявление фенотипических признаков нейрогенной дифференцировки, подтвержденной выявлением экспрессии маркеров дифференцировки GFAP и β-тубулина.

При отсутствии общепринятого набора маркеров ОСК Hasselbach L. A. с соавт. [31] предложили использовать клетки, полученные в результате сортировки обычных ОСК-обогащенных культур. Клетки глиобластом, отобранные по способности образовывать нейросферы в питательной среде культур с ростовыми факторами, экспрессировали маркеры НСК. При этом экспрессия Sox2 и нестина постоянно выявлялась в клетках нейросфер, в то время как белок CD133 присутствовал лишь в нейросферах, образованных клетками глиобластом [38].

Hasselbach L. A. с соавт. [31] оптимизировали также протокол ферментативной диссоциации опухолевой ткани глиобластом на материале более 100 образцов. В долгосрочных культурах эффективность получения нейросфер составила более 40%. Такие нейросферы демонстрировали туморогенность, мультилинейный дифференцировочный потенциал, сохраняли генотип оригинальной опухоли, в отличие от культур с наличием 10% фетальной сыворотки, а также воспроизводили гистоструктуру оригинальной опухоли после ортотопической имплантации ОСК в мозг иммунодефицитных мышей.

Кроме того, в работе приведены альтернативные протоколы постоянного или периодического культивирования опухолей в бессывороточной среде в присутствии EGF и bFGF. Для селекции клеток с фенотипом ОСК авторами разработан пошаговый протокол получения нейросфер из диссоциированных хирургических образцов глиобластом в монослойных культурах, растущих на поверхностях, покрытых протеином.

В другой серии исследований Hasselbach L. A. с соавт. [31] провели сравнение первичных клеток глиобластом, культивированных либо в среде для нейросфер с добавлением факторов роста, либо в традиционной питательной среде с добавлением 10% фетальной сыворотки. Изоляция ОСК из диссоциированных клеток опухолей глиобластом проводилась при помощи клеточного сортирования, основанного на экспрессии маркера ОСК CD133 [21, 45]. При этом оказалось, что фенотип ОСК не постоянно связан с экспрессией этого маркера, на что указывают также Beier D. с соавт. [46], Joo K. M. с соавт. [47], Son M. J. с соавт. [48].

V. Clement с соавт. [49] также считают, что предлагаемый в качестве маркера ОСК CD133 не может использоваться с достаточной специфичностью для идентификации опухолевых клеток со стволовыми свойствами. В связи с этим авторы предложили альтернативный метод изоляции субпопуляции свежeweделенных опухолевых клеток из ткани глиомы человека и культур глиомы, основанный на фенотипических признаках глиома-иницирующих клеток без использования молекулярных маркеров, а именно на способности исследуемых клеток к автофлюоресценции на канале FL1. Показано, что такие клетки способны к самовозобновлению *in vitro*, туморогенезу *in vivo* и избирательно экспрессируют гены стволовых клеток. По мнению авторов, данный метод в исследовании туморогенного потенциала глиом может оптимизировать разработку новых терапевтических и диагностических подходов в лечении глиом человека.

Таким образом, в многочисленных исследованиях, посвященных методам изоляции и идентификации ОСК в злокачественных глиомах

головного мозга, метод культивирования нейросфер получил широкое распространение и стал определяющим подходом благодаря возможности сохранения молекулярных особенностей ОСК исходных тканей глиобластом и их туморогенного потенциала [8, 16, 24, 36, 37, 39, 50-52].

Большой интерес представляют работы, в которых анализируется прогностическое значение активности нейросферообразования в культуре и экспрессии маркеров ОСК для клинической оценки исхода злокачественных глиом головного мозга [22, 53-57].

На основании этих исследований установлена тесная взаимосвязь между клиническими исходами и содержанием ОСК в ткани глиом, что подтверждается формированием туморосфер в культуре, экспрессией стволовых маркеров и генетическими признаками ОСК [9-13, 22, 24, 53-58].

Так, Laks D. R. с соавт. [24] в ретроспективном исследовании на образцах 32 глиом в культуре изучали соотношение между их способностью к нейросферообразованию, туморогенностью и исходом болезни пациентов. На основании мультивариантного анализа взаимосвязи между этими показателями установлено, что активность формирования нейросфер является стойким прогностическим признаком прогрессии глиомы, исхода заболевания, а также повышенного риска смерти пациента независимо от индекса пролиферации Ki67 в исходной ткани опухоли. Авторы утверждают, что культура нейросфер является информативной моделью для исследования биологии злокачественных глиом.

В. Н. Kong с соавт. [59] при культивировании образцов глиобластом 39 пациентов, получавших после операции химиотерапию и радиотерапию, наблюдали формирование туморосфер, в которых ОСК экспрессировали иммуноцитохимические маркеры PDPN, CD133 и нестин, а также проявляли способность к нейрогенной дифференцировке и индукции туморогенеза *in vivo*. Анализ зависимости уровня нейросферообразования ОСК в культуре и критерия выживаемости пациентов показал статистически достоверные различия полной выживаемости у позитивных и негативных по выявлению ОСК пациентов с первичной глиобластомой. В. Н. Kong. с соавт. [59] также считают, что оценка активности туморосферообразования глиобластом в культуре является независимым прогностическим фактором клинического исхода у этих пациентов. В то же время авторы предполагают, что в связи с временной длительностью культивирования опухолей для получения нейросфер этот метод может оказаться неприемлемым для прогнозирования исхода болезни при первичных глиобластомах с коротким периодом выживаемости пациентов. В таких случаях более предпочтительной является оценка экспрессии поверхностных антигенов ОСК в нативной ткани этих опухолей.

Углубленное изучение биологии ОСК приобрело особое важное теоретическое и практическое значение для совершенствования методов повышения эффективности адьювантной терапии опухолей головного мозга. Этой цели посвящены исследовательские разработки ряда мировых лабораторий. Считается, что именно субпопуляция ОСК может быть критической терапевтической мишенью для достижения полного или долгосрочного ответа злокачественных глиом на их терапевтическое лечение [54, 60, 61].

К настоящему времени установлено, что клетки глиомы, обогащенные субпопуляцией ОСК, выявляя повышенную резистентность к облучению – основному стандартному средству в лечении злокачественных глиом, поскольку именно ОСК активируют пути внутриклеточного ответа на радиационные повреждения ДНК, быстро их репарируя [45]. Кроме того, ОСК играют ключевую роль в образовании новых кровеносных сосудов, обеспечивающих прогрессивный и продолженный рост злокачественных глиом после частичного их удаления [62].

Ранее К. Mishima с соавт. [23] и А. Ernst с соавт. [63] сообщали, что экспрессия PDPN оказалась прогностически значимой у пациентов с астроцитоматами. Экспрессию нестина в ОСК Т. Strojnik с соавт. [64] и CD133 R. Pallini с соавт. [65] связывали с плохими исходами

опухолей мозга и многих раков. Однако при анализе взаимосвязи между экспрессией отдельных иммуноцитохимических маркеров PDPN, CD133 и нестина в ОСК культур и выживаемостью пациентов с глиобластомами Kong В. Н. с соавт. [59] не удалось выявить отчетливых закономерностей. Так, оказалось, что среднее время выживаемости в группах больных с позитивной и негативной экспрессией PDPN в ОСК оказалось сходным, составляя 400 и 408 дней соответственно. При этом экспрессия CD133 и нестина выявлена в культивированных ОСК большинства пациентов. Лишь в одном случае обнаружена негативная экспрессия этих маркеров в культурах клеток глиобластом, поэтому авторы не смогли провести статистическое сравнение этих двух групп. Аналогичные результаты получены Chinnaiyan P. с соавт. [66].

В последние годы ОСК злокачественных глиом стали использоваться для тестирования противоопухолевых препаратов. С этой целью все чаще привлекаются культуры ОСК нейросфер, полученных из экспериментальных линий злокачественных глиом, которые считаются общепринятой доклинической моделью для разработки новых терапевтических стратегий.

Наиболее перспективными моделями являются высокоинвазивные интракраниальные опухоли мышей линии СТ-2А, полученной из злокачественной астроцитомы, индуцированной интрацеребральным введением 20-methylcholanthrene мышам линии C57/BL6 [18]. На культурах нейросфер этой линии Е. Binello с соавт. [18] подтвердили стволовые свойства ОСК, а также оптимизировали воспроизводимость инъекционных параметров.

Е. Binello с соавт. [18] также считают очевидным участие ОСК в развитии глиом человека высокой степени злокачественности, резистентных к стандартной терапии, и обнаружили, что экспрессия маркера ОСК CD133 в культурах СТ-2А увеличивается с 2% в клетках монослоя до 31% в клетках нейросфер. Исследование маркеров ОСК (Oct4, Nanog и нестин) показало различия характеристик клеток монослоя, экспрессирующих Oct4 и нестин (но не Nanog), и клеток нейросфер, экспрессирующих все три маркера. Кроме того, клетки СТ-2А показали более высокую пролиферацию и агрессивность по сравнению с клетками U87, а клетки нейросфер СТ-2А имели более высокий пролиферативный потенциал, чем клеточный монослой *in vitro*. В связи с этим авторы предлагают использовать эту модель в доклиническом тестировании новых терапевтических средств против глиом человека высокой степени злокачественности [18].

Burkhardt J. K. с соавт. [67] провели сравнительное исследование воздействия ряда химиотерапевтических агентов на нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСК) и ОСК глиомы на клеточных линиях НСК и ОСК в условиях культивирования. Показано, что НСК в сравнении с ОСК более уязвимы к воздействию, в частности, темозолимида и карбоплатина. Классическая экспрессия MGMT была сходной в обеих клеточных линиях и не объясняет наблюдаемых различий в резистентности клеток к темозолимиду. В то же время не отмечено различий между ОСК и НСК в экспрессии репарирующих ферментов MLH1 и MLH2, ответственных за развитие резистентности к цисплатину. Однако ОСК глиомы показали в 10 раз более высокий уровень ABCG2, который способствует удалению из клетки токсичных препаратов.

Авторы обнаружили также, что Bortezomib (BTZ) – протеасомный ингибитор, и Erlotinib (ERL) – EGF ингибитор тирозинкиназы, снижали жизнеспособность ОСК, минимально воздействуя на НСК. После лечения больных BTZ установлено значительное повышение активности каспазы-3 – ключевого фермента апоптоза, в ОСК при отсутствии этого признака в НСК. Однако, в отличие от ОСК глиом, активность протеасом в НСК оказалась повышенной в 5-7 раз. Эффект воздействия ERL на ОСК глиом Burkhardt J. K. с соавт. [67] поясняют более высоким уровнем экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), в отличие от НСК.

Gong X. с соавт. [68] показали, что протеасомный ингибитор Bortezomib и рецептор ингибитор тирозинкиназы Erlotinib снижают

пролиферацию именно ОСК глиом, не влияя на жизнеспособность НСК. В то же время установлено, что широко применяемые для лечения глиом Тemozolomide и цисплатин оказались более токсичными для нормальных НСК в сравнении с ОСК. Таким образом, обнаружено, что классические химиотерапевтические препараты, используемые для лечения глиобластом, в условиях *in vitro* выявляют различные эффекты воздействия на НСК и ОСК.

Основным выводом приведенных работ является необходимость поиска лекарственных средств, избирательно воздействующих на ОСК глиомы, не повреждая при этом здоровую ткань мозга и нормальные НСК [67, 68]. Представленные наблюдения могут инициировать новые направления исследований в поисках противоопухолевых агентов, специфичных для ОСК и не влияющих на нормальные НСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный обзор литературы свидетельствует о том, что, несмотря на большой объем накопленной информации в отношении биологии опухолевых стволовых клеток, их уточненная идентификация и клеточный генез в глиомах головного мозга до сих пор остаются невыясненными, нередко противоречивыми и требуют проведения дальнейших исследований. Тем не менее обнаружение ОСК в глиомах головного мозга существенно изменило взгляды ученых на биологию этих опухолей и заставило переосмыслить современные стратегии в лечении этих заболеваний. Несмотря на существующие в литературе разногласия в отношении терминологических определений, молекулярно-генетических характеристик ОСК и их участия в туморогенезе *in vivo*, неоспоримым является то, что глиомы содержат клеточные субпопуляции ОСК, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, определяющим прогрессирование опухоли, их терапевтическую резистентность к химио- и радиотерапии и продолженный рост после хирургической резекции. Это подтверждается клиническими наблюдениями короткой клинической ремиссии при комбинированном лечении больных злокачественными глиомами с высоким содержанием ОСК. Поэтому на современном этапе углубленное изучение биологии ОСК в глиомах головного мозга представляет важное научное направление и подтверждает актуальность дальнейших исследований биологии стволовых клеток злокачественных глиом.

Привлечение с этой целью экспериментального метода культивирования тканей внесло существенный вклад в решение проблемы. Общеизвестно, что метод культивирования обеспечивает широкие возможности для выделения из ткани исходных опухолей популяции ОСК в составе нейросфер, позволяет прижизненно наблюдать динамику их роста на протяжении многих пассажей и является высокоинформативным способом изучения биологии ОСК злокачественных глиом. Многочисленными исследованиями показано, что возобновляемое формирование нейросфер (туморосфер) в культуре является фундаментальным свойством опухолевых стволовых клеток, которые инициируют рост опухолей в ткани головного мозга. При этом количественная оценка активности нейросферообразования опухолевых стволовых клеток в динамике культивирования отражает степень пролиферативного потенциала и злокачественности исходных опухолей.

Важным аспектом в изучении биологии ОСК являются также их метаболические характеристики. Метод культивирования, позволяющий выделять из ткани опухоли популяции этих клеток, создает возможность иммуногистохимической и генетической идентификации клеточного состава нейросфер и поэтому широко используется с целью сравнительного исследования ОСК, полученных из ткани глиом головного мозга различной гистоструктуры и степени анаплазии.

С помощью метода культивирования экспериментальных клеточных линий глиом удалось выявить также индивидуальные колебания выхода опухолевых стволовых клеток из разных глиальных линий, что свидетельствует о различной способности формировать нейросферы и указывает на различные соотношения между содержанием активно пролиферирующих ОСК и более дифференцированных транзиторно-амплифицированных клеток в исходной ткани этих опухолей.

В последние годы культуры нейросфер, полученные из опухолей мозга человека и экспериментальных животных, стали использоваться для тестирования активности противоопухолевых препаратов на доклиническом этапе. Благодаря этим исследованиям получены важнейшие данные для современной практической нейроонкологии. Оказалось, что классические химиотерапевтические препараты, используемые для лечения глиобластом, в условиях культивирования выявляют различные эффекты при воздействии на нормальные НСК и ОСК. Основным выводом проанализированных работ является необходимость поиска лекарственных средств, избирательно воздействующих на опухолевые стволовые клетки глиом, не затрагивая при этом здоровую ткань мозга и нормальные НСК. Эти наблюдения могут инициировать новые направления исследований в поисках повреждающих агентов, специфичных для ОСК и не влияющих на нормальные НСК. Анализ результатов приведенной литературы подтверждает актуальность разработки новых терапевтических подходов, направленных против опухолевых стволовых клеток глиом с привлечением метода культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glioblastoma Stem-Like Cells – Biology and Therapeutic Implications [Text] / D. B. Gursel, B. J. Shin, J.-K. Burkhardt, et al. // *Cancers*. – 2011. – Vol. 3, № 2. – P. 2655-2666.
2. Park D. M. Biology of Glioma Cancer Stem Cells [Text] / D. M. Park, J. N. Rich // *Mol. Cells*. – 2009. – Vol. 28. – P. 7-12.
3. Лисянский Н. И. Иммунология и иммунотерапия злокачественных глиом головного мозга. Серия «Нейроиммунология» [Текст] / Н. И. Лисянский // К.: Интерсервис, 2011. – Т. 5. – 240 с.
4. Wang J. C. Evaluating Therapeutic efficacy against cancer stem cells: New challenges posed by a new paradigm [Text] / J. C. Wang // *Cell Stem Cell*. – 2007. – № 1. – P. 497-501.
5. New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans [Text] / A. M. Bleau, B. M. Howard, L. A. Taylor, et al. // *Neurosurg. Focus*. – 2008. – Vol. 24, № 3-4. – E 28.
6. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens [Text] / S. M. Pollard, K. Yoshikawa, I. D. Clarke, et al. // *Cell Stem Cell*. – 2009. – № 4. – P. 568-580.

7. *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**. – P. 811–822.
8. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines [Text] / *J. Lee, S. Kotliarova, Y. Kotliarov, et al.* // *Cancer Cell.* – 2006. – **Vol. 9**. – P. 391–403.
9. Isolation of glioma cancer stem cells in relation to histological grades in glioma specimens [Text] / *B. H. Kong, N.-R. Park, J.-K. Shim, et al.* // *Child's Nervous System.* – 2013. – **Vol. 29, № 2**. – P. 217–229.
10. Mammosphere-derived gene set predicts outcome in patients with ER-positive breast cancer [Text] / *M. Kok, R. H. Koornstra, T. C. Margarido, et al.* // *The Journal of Pathology.* – 2009. – **Vol. 218, № 3**. – P. 316–326.
11. Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance [Text] / *H. S. Kim, S. Y. Yoo, K. T. Kim, et al.* // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* – 2012. – **Vol. 5, № 8**. – P. 754–761.
12. Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer [Text] / *G. Pirozzi, V. Tirino, R. Camerlingo, et al.* // *Oncology Reports.* – 2013. – **Vol. 29, № 5**. – P. 1763–1768.
13. Differentially expressed miRNAs in cancer-stem-like cells: markers for tumor cell aggressiveness of pancreatic cancer [Text] / *B. Bao, S. Ali, A. Ahmad, et al.* // *Stem Cells and Development.* – 2014. – **Vol. 23, № 16**. – P. 1947–1958.
14. Stem cell factor is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection [Text] / *X. Wang, H. Ren, T. Zhao, et al.* // *Carcinogenesis.* – 2014. – **Vol. 35, № 10**. – P. 2283–2290.
15. Stem cells cancer and cancer stem cells [Text] / *T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, et al.* // *Nature.* – 2001. – **Vol. 414**. – P. 105–111.
16. Identification of Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors [Text] / *S. K. Singh, I. D. Clarke, M. Terasaki, et al.* // *Cancer Res.* – 2003. – **Vol. 63, № 18**. – P. 5821–5828.
17. *Sulman E.* Brain tumor stem cells [Text] / *E. Sulman, K. Aldape, H. Colman* // *Current Problems in Cancer.* – 2008. – **Vol. 32, № 3**. – P. 124–142.
18. Stemness of the CT-2A Immunocompetent Mouse Brain Tumor Model: Characterization In Vitro [Text] / *E. Binello, Z. A. Qadeer, H. P. Kothari, L. Emdad, et al.* // *J. Cancer.* – 2012. – **Vol. 3**. – P. 166–174.
19. *Dahlstrand J.* Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors [Text] / *J. Dahlstrand, V. P. Collins, U. Lendahl* // *Cancer res.* – 1992. – **Vol. 52**. – P. 5334–5341.
20. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells [Text] / *T. Tohyama, V. M. Lee, L. B. Rorke, et al.* // *Lab. Invest.* – 1992. – **Vol. 66**. – P. 303–313.
21. Identification of human brain tumor initiating cells [Text] / *S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke, et al.* // *Nature.* – 2004. – **Vol. 432**. – P. 396–401.
22. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors [Text] / *I. Ben-Porath, N. W. Thomson, V. J. Carev, et al.* // *Nat. Genet.* – 2008. – **Vol. 40**. – P. 499–507.
23. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression [Text] / *K. Mishima, Y. Kato, M. K. Kaneko, et al.* // *Acta Neuropathologica.* – 2006. – **Vol. 111, № 5**. – P. 483–488.
24. Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma [Text] / *D. R. Laks, M. Masterman-Smith, K. Visnyei, et al.* // *Stem Cells.* – 2009. – **Vol. 27, № 4**. – P. 980–987.
25. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? [Text] / *R. H. Dahlrot, S. K. Hermansen, S. Hansen, et al.* // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* – 2013. – **Vol. 6, № 3**. – P. 334–348.
26. Christensen K. CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas [Text] / *K. Christensen, H. D. Schröder, B. W. Kristensen* // *Journal of Neuro-Oncology.* – 2008. – **Vol. 90, № 2**. – P. 157–170.
27. The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas [Text] / *K.-J. Kim, K.-H. Lee, H.-S. Kim, et al.* // *Neuropathology.* – 2011. – **Vol. 31, № 5**. – P. 494–502.
28. Expression of podoplanin is a rare event in sporadic gastrointestinal stromal tumors and does not influence prognosis [Text] / *S. F. Schoppmann, A. S. Berghoff, B. Jesch, et al.* // *Future Oncology.* – 2012. – **Vol. 8, № 7**. – P. 859–866.
29. *Reynolds B.A.* A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes [Text] / *B. A. Reynolds, W. Tetzlaff, S. Weiss* // *J. Neurosci.* – 1992. – **Vol. 12**. – P. 4565–4574.
30. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology [Text] / *I. Singec, R. Knoth, R. P. Meyer, et al.* // *Nat. Methods.* – 2006. – **Vol. 3**. – P. 801–806.
31. Optimization of High Grade Glioma Cell Culture from Surgical Specimens for Use in Clinically Relevant Animal Models and 3D Immunocytochemistry [Text] / *L. A. Hasselbach, S. M. Irtenkauf, N. W. Lemke, et al.* // *J. Vis. Exp.* – 2014. – **Vol. 83, e51088**. – P. 1–9.
32. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines [Text] / *L. Qiang, Y. Yang, Y. J. Ma, et al.* // *Cancer Lett.* – 2009. – **Vol. 279, № 1**. – P. 13–21.
33. *Gilbert C. A.* Cancer Stem cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Therapies [Text] / *C. A. Gilbert, A. H. Ross* // *J. Cell. Biochem.* – 2009. – **Vol. 108, № 5**. – P. 1031–1038.
34. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors [Text] / *H. D. Hemmati, I. Nakano, J. A. Lazareff, et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **Vol. 100**. – P. 15178–15183.
35. *Ahmed S.* The culture of neural stem cells [Text] / *S. Ahmed* // *J. Cell Biochem.* – 2009. – **Vol. 106**. – P. 1–6.
36. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma [Text] / *R. Galli, E. Binda, U. Orfanelli, et al.* // *Cancer Res.* – 2004. – **Vol. 64, № 19**. – P. 7011–7021.
37. *Vescovi A. L.* Brain tumour stem cells [Text] / *A. L. Vescovi, R. Galli, B. A. Reynolds* // *Nat. Rev. Cancer.* – 2006. – **Vol. 6**. – P. 425–436.
38. Gliosarcoma Stem Cells Undergo Glial and Mesenchymal Differentiation In Vivo [Text] / *A. C. deCarvalho, K. Nelson, N. Lemke, N. L. Lehman, A. S. Arbab, S. Kalkanis, T. Mikkelsen* // *Stem Cells.* – 2010. – **Vol. 28, № 2**. – P. 181–190.
39. Isolation and expansion of human glioblastoma multiforme tumor cells using the neurosphere assay [Text] / *H. Azari, S. Millette, S. Ansari, et al.* // *J. Vis. Exp.* – 2011. – **Vol. 56, e3633**. – P. 1–5.
40. *Woolard K.* Glioma stem cells: better flat than round [Text] / *K. Woolard, H. A. Fine* // *Cell Stem Cell.* – 2009. – **Vol. 4**. – P. 466–467.
41. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery [Text] / *S. Facchino, M. Abdouh, W. Chato, et al.* // *J. Neurosci.* – 2010. – **Vol. 28, № 30**. – P. 1096–1111.
42. Implantation of GL261 neurospheres into C57/BL6 mice: a more reliable syngeneic graft model for research on glioma-initiating cells [Text] / *L. Yi, C. Zhou, B. Wang, et al.* // *Int. J. Oncol.* – 2013. – **Vol. 43, № 2**. – P. 477–484.
43. In vitro analysis of neurospheres derived from glioblastoma primary culture: a novel methodology paradigm [Text] / *L. F. Pavon, L. C. Marti, T. T. Sibov, et al.* // *Front. Neurol.* – 2014. – **Vol. 4**. – P. 214–220.

44. Cancer stem cells from a rare form of glioblastoma multiforme involving the neurogenic ventricular wall [Text] / S. C. Li, T. V. Long, H. W. Ho, et al. // *Cancer Cell International*. – 2012. – **Vol. 12**. – P. 41–60.
45. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [Text] / S. Bao, Q. Wu, D. E. McLendon, et al. // *Nature*. – 2006a. – **Vol. 444**. – P. 756–760.
46. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cell show differential growth characteristics and molecular profiles [Text] / D. Beier, P. Hau, M. Proescholdt, et al. // *Cancer Res*. – 2007. – **Vol. 67**. – P. 4010–4015.
47. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas [Text] / K. M. Joo, S. Y. Kim, X. Jin, et al. // *Lab. Invest*. – 2008. – **Vol. 88**. – P. 808–815.
48. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma [Text] / M. J. Son, K. Woolard, D. H. Nam, et al. // *Cell Stem Cell*. – 2009. – **Vol. 4**. – P. 440–452.
49. Marker-independent identification of glioma-initiating cells [Text] / V. Clement, D. Marino, C. Cudalbu, et al. // *Nature Methods*. – 2010. – **№ 7**. – P. 224–228.
50. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro [Text] / T. N. Ignatova, V. G. Kukekov, E. D. Laywell, et al. // *Glia*. – 2002. – **Vol. 39, № 3**. – P. 193–206.
51. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme [Text] / X. Yuan, J. Curtin, Y. Xion, et al. // *Oncogene*. – 2004. – **Vol. 23**. – P. 9392–9400.
52. Germano I. M. Primary brain tumors, neural stem cells, and brain tumor cancer cells: Where is the link? [Text] / I. M. Germano, V. Swiss, P. Casaccia // *Neuropharmacol*. – 2010. – **Vol. 58, № 6**. – P. 903–910.
53. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival [Text] / T. Stojnik, G. V. Røslund, P. O. Sakariassen, et al. // *Surgical Neurology*. – 2007. – **Vol. 68, № 2**. – P. 133–143.
54. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma [Text] / D. Beier, S. Rohrl, D. R. Pillai, et al. // *Cancer Res*. – 2008. – **Vol. 68**. – P. 5706–5715.
55. Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme [Text] / R. Pallini, L. Ricci-Vitiani, G. L. Banna, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – **Vol. 14, № 24**. – P. 8205–8212.
56. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients [Text] / F. Zeppernick, R. Ahmadi, B. Campos, et al. // *Clin Cancer Res*. – 2008. – **Vol. 14, № 1**. – P. 123–129.
57. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients [Text] / M. Zhang, T. Song, L. Yang, et al. // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2008. – **Vol. 27**. – P. 85–92.
58. Stem cell factor is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection [Text] / X. Wang, H. Ren, T. Zhao, et al. // *Carcinogenesis*. – 2014. – **Vol. 35, № 10**. – P. 2283–2290.
59. Prognostic Value of Glioma Cancer Stem Cell Isolation in Survival of Primary Glioblastoma Patients [Text] / B. H. Kong, J. H. Moon, U. M. Huh, et al. // *Stem Cells International*. – 2014. – **Vol. 2014, Article ID 838950**. – 6 p.
60. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth [Text] / S. Bao, Q. Wu, Z. Li, et al. // *Cancer Res*. – 2008. – **Vol. 68**. – P. 7043–7048.
61. Dietrich J. Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas [Text] / J. Dietrich, J. Imitola, S. Kesari // *Nat.Clin.Pract*. – 2008. – **Vol. 5**. – P. 393–404.
62. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor [Text] / S. Bao, Q. Wu, S. Sathornsumetee, et al. // *Cancer Res*. – 2006. – **Vol. 66**. – P. 7843–7848.
63. Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival [Text] / A. Ernst, S. Hofmann, R. Ahmadi, et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – **Vol. 15, № 21**. – P. 6541–6550.
64. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progress of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival [Text] / T. Stojnik, G. V. Roslund, P. O. Sakariassen, et al. // *Surg Neurol*. – 2007. – **Vol. 68, № 2**. – P. 133–144.
65. Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme [Text] / R. Pallini, L. Ricci-Vitiani, G. L. Banna, et al. // *Clin Cancer Res*. – 2008. – **Vol. 14, № 24**. – P. 8205–8212.
66. The prognostic value of nestin expression in newly diagnosed glioblastoma: report from the radiation therapy oncology group [Text] / P. Chinnaiyan, M. Wang, A. M. Rojiani, et al. // *Radiation Oncology*. – 2008. – **Vol. 3, № 1**. – P. 32–40.
67. Burkhardt J.K. Neural Stem Cells and Glioma Stem-Like Cells Respond Differently to Chemotherapeutic Drugs: Selectivity at the Cellular Level [Text] / J. K. Burkhardt, B. J. Shin, J. A. Boockvar // *Neurosurgery*. – 2011. – **Vol. 68, № 6**. – P. 21–22.
68. Neural stem/progenitors and glioma stem-like cells have differential sensitivity to chemotherapy [Text] / X. Gong, P. H. Schwartz, M. E. Linskey, D. A. Bota // *Neurology*. – 2011. – **Vol. 76, № 13**. – P. 1126–1134.



СТАТЬЯ НА САЙТЕ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Авторы подтверждают отсутствие возможных конфликтов интересов.

Поступила в редакцию 20.07.2015 г.

Принята к печати 29.09.2015 г.