

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии
и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

На правах рукописи

КИСЕЛЕВА

Любовь Николаевна

**Исследование действия облучения и фотемустина на выживаемость и популяционный
состав клеточных линий глиобластом человека**

03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Самойлович Марина Платоновна

Санкт-Петербург – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	10
1. Гистологическое происхождение и классификация глиом.	10
1.2. Гетерогенность глиобластом.	10
1.2.1. Морфологическая характеристика.	10
1.2.2. Фенотип клеток глиобластом.	11
1.2.3. Стволовые клетки глиобластом.	16
1.3. Действие препаратов хлорэтилнитрозомочевины и ионизирующего излучения на клетки.	20
1.4. Некоторые факторы прогрессии глиобластом.	23
1.4.1. Роль ростовых факторов и микроокружения в прогрессии глиобластом.	23
1.4.2. Эпителиально-мезенхимальный переход как фактор прогрессии глиобластом.	25
1.4.3. Гигантские полиплоидные клетки.	28
1.5. Линии культивируемых клеток глиобластом – модельные объекты для исследования подходов в терапии глиобластом.	31
Заключение.	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.	35
2.1. Клеточные линии.	35
2.2. Морфологические исследования.	35
2.3. Иммуноцитохимические исследования.	36
2.4. Воздействие фотемустина на клетки глиобластом.	36
2.5. Определение жизнеспособности клеток методом МТТ.	37
2.6. Облучение клеточных линий глиобластом.	37
2.7. Проточная цитометрия.	41
2.7.1. Проточная иммуноцитофлуориметрия.	41
2.7.2. ДНК цитометрия.	41
2.8. Исследование активности генов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.	42
2.9. Статистическая обработка.	43
2.10. Используемые реактивы и расходные материалы.	44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.	45
3.1. Морфологическая и иммуноцитохимическая характеристика клеток линий глиобластом.	45
3.2. Характеристика роста клеточных линий глиобластом.	47

3.3. Характеристика клеток глиобластом по экспрессии поверхностных маркеров.	48
3.4. Исследование активности генов в клетках глиобластом	51
3.5. Воздействие фотемустина на клетки глиобластом	52
3.5.1. Определение дозовой зависимости действия фотемустина на клеточные линии.	52
3.5.2. Влияние фотемустина на распределение клеток по фазам клеточного цикла.	53
3.5.3. Воздействие фотемустина на морфологические характеристики клеточных линий глиобластом.	54
3.5.4. Эффекты действия фотемустина на выживаемость и пролиферацию клеток глиобластом.	56
3.5.5. Экспрессия поверхностных маркеров на клетках глиобластом после действия фотемустина.	59
3.5.6. Исследование активности генов в клетках глиобластом, подвергнутых действию фотемустина.	62
3.6. Эффекты воздействия ионизирующего излучения на клетки глиобластом.	65
3.6.1. Влияние облучения на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом.	65
3.6.2. Экспрессия поверхностных маркеров на клетках глиобластом после облучения	67
3.6.3. Исследование активности генов в клетках глиобластом после разных доз облучения . . .	69
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.	73
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	81
ВЫВОДЫ.	82
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	85
ПРИЛОЖЕНИЕ.	102

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Глиобластомы являются одними из наиболее распространенных опухолей головного мозга человека. Для лечения глиобластом используют протоколы, включающие хирургическое удаление опухоли, лучевую и химиотерапию. После проведения терапии в значительном числе случаев возникают рецидивы, которые проявляют более высокую резистентность к повторному лечению, чем исходные опухоли. Проблема рецидивов глиобластом остается не решенной до настоящего времени. Выживаемость пациентов с глиобластомой обычно не превышает 15 мес [McCutcheon I.E., Preul M.C., 2021].

Повышение резистентности опухолей к повторному воздействию связывают в первую очередь с селекцией клеточных популяций, более устойчивых к действию генотоксических факторов. Более высокой устойчивостью к действию химиопрепаратов и облучения, чем обычные опухолевые клетки, обладают стволовые клетки глиобластом, которые являются инициаторами опухолевого роста. Панель маркеров, идентифицирующих эти клетки, до настоящего времени не определена. Причиной этому может служить высокая гетерогенность глиобластом. Глиобластомы – опухоли, различающиеся по морфологии, фенотипу и молекулярно-генетическим особенностям. Согласно профилю генной экспрессии глиобластомы разделяют на четыре подтипа: классический, proneйральный, нейральный и мезенхимальный [Verhaak R.G. et al., 2010]. Опухоли proneйрального подтипа характеризуются относительно благоприятным прогнозом, наиболее агрессивное течение свойственно мезенхимальному подтипу. Стволовые клетки proneйрального и мезенхимального типов различаются по фенотипическим и генетическим особенностям, в частности по генам, связанным с клеточным циклом и репарацией, сплайсингом и экспрессией длинной некодирующей РНК [Никитин П.В. и др., 2019; Guardia G.D. et al., 2020]. Стволовые клетки мезенхимального типа обладают высокой устойчивостью к действию генотоксических факторов. Стволовые клетки proneйрального типа исходно чувствительны к воздействию, однако они могут становиться резистентными посредством перехода к мезенхимальному типу [Fedele M. et al., 2019; Minata M. et al., 2019]. В рецидивирующих глиобластомах отмечено изменение экспрессии генов в сторону более агрессивного мезенхимального подтипа [Phillips H.S. et al., 2006; Fedele M. et al., 2019].

В прогрессию глиобластом может быть вовлечен эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), для которого характерно увеличение экспрессии мезенхимальных маркеров и приобретение клетками мезенхимного фенотипа. ЭМП в клетках глиобластом регулируется множественными сигнальными путями. Основными активаторами сигнальных путей,

связанных с ЭМП, являются ростовые факторы: эпидермальный ростовой фактор (EGF); трансформирующий ростовой фактор β (TGF β), фактор роста гепатоцитов (HGF). При развитии ЭМП происходит активация транскрипционных факторов (Snail, Twist, Slug, Zeb) и увеличение экспрессии мезенхимальных маркеров [Mahabir R. et al., 2014; Dongre A., Weinberg R.A. et al., 2019]. В результате ЭМП клетки приобретают более высокую мобильную способность и инвазивные свойства. В прогрессии глиобластом участвуют также белки внеклеточного матрикса, которые продуцируют сами опухолевые клетки – тенасцин С (TNC), связанный с инвазивностью и участвующий в процессах неоангиогенеза, и тромбоспондин-1 (THBS1), являющийся основным индуктором TGF β . Вышеизложенное свидетельствует об актуальности проведения исследования популяционного состава линий глиобластом и активности в клетках генов таких ростовых факторов, как EGF, HGF, TGF β 1, белков матрикса TNC и THBS1, и маркеров, ассоциированных с ЭМП (α SMA, FAP, Zeb1).

При лучевой терапии глиобластом стандартным режимом воздействия является фракционированное облучение в дозе 2,0 Гр с суммарной очаговой дозой 60 Гр [Клинические рекомендации, 2020]. Дозы стандартной лучевой терапии, применяемые в исследованиях на клеточных линиях, принято считать условно терапевтическими. Одним из направлений в лечении глиобластом является использование химиотерапевтических препаратов из группы производных нитрозомочевины, в частности фотемустина (ФМ), который применяют при лечении рецидивирующих злокачественных глиом [Addeo R. et al., 2019]. Этот препарат проходит гематоэнцефалический барьер и обладает высокой способностью проникать в опухолевые клетки. В отличие от других соединений нитрозомочевины ФМ образует меньше разрывов ДНК и больше сшивок между молекулами ДНК или ДНК и белками. В литературе количество сведений о влиянии этого препарата на клетки глиобластом очень ограничено.

Лабораторные исследования цитотоксического действия химиопрепаратов проводят на клеточных линиях, различающихся по своим характеристикам, однако такие исследования, как правило, краткосрочны и ограничены 7–14 днями [Чернов А.Н. и др., 2018; Mirzayans R. et al., 2018b]. Формирование популяций резистентных клеток может занимать месяцы и не учитывается при проведении стандартных тестов [Mirzayans R. et al., 2020]. Исследование клеток глиобластом в отдаленные сроки после воздействия химиопрепаратов и облучения может дать ответы на вопросы, связанные с проблемой рецидивирования глиобластом.

Цель исследования

Оценить действие облучения и препарата фотемустин на выживаемость и популяционный состав клеток культивируемых линий глиобластом, а также на активность в них генов факторов, влияющих на прогрессию опухолей.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать и сравнить новые клеточные линии глиобластом с широко используемыми линиями глиобластом A172 и T98G по скорости роста, присутствию внутриклеточных и поверхностных маркерных белков, активности генов, кодирующих ряд ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения.
2. Определить параметры выживаемости культивируемых клеток глиобластом после воздействия различных доз ФМ и облучения в разных режимах.
3. Оценить действие ФМ в сублетальных дозах на популяционный состав клеточных линий глиобластом путем определения поверхностных маркеров, а также уровня экспрессии в клетках генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения.
4. Оценить действие ионизирующего излучения в сублетальных дозах на популяционный состав клеток в линиях глиобластом по поверхностным маркерам и уровню экспрессии в клетках генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения.

Научная новизна исследования

В результате исследования реакции клеточных линий глиобластом человека на действие ионизирующего излучения и ФМ были описаны факты, не отраженные ранее в научной литературе. Так было выделено два типа реагирования клеточных линий глиобластом на действие одних и тех же генотоксических факторов. Линии глиобластом A172 и R1, изначально содержавшие популяции клеток, экспрессирующих нейрональные маркеры CD56 и CD133, после действия облучения или ФМ в невысоких сублетальных дозах (36 Гр, 50 мкг/мл), характеризовались снижением активности генов ряда факторов, связанных с прогрессией опухолей. Снижение экспрессии было наиболее выражено для генов *HGF*, *TNC*, *TGFβ1*. На действие ионизирующего излучения или ФМ в высоких дозах (50 Гр, 300 мкг/мл) эти линии глиобластом отвечали гибелью всех популяций. В других линиях глиобластом T98G и T2, не экспрессирующих нейрональные маркеры CD56 и CD133, после облучения или действия ФМ происходила активация генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и белков, связанных с мезенхимным фенотипом. Максимальное увеличение активности выявлено для генов *HGF*, *TNC* и *FAP*. Эти клеточные линии сохраняли жизнеспособность после генотоксических воздействий в высоких дозах за счет формирования гигантских непролиферирующих клеток (срок наблюдения 1,5–2 мес).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, носят как фундаментальный, так и прикладной характер. В работе были охарактеризованы две новые клеточные линии глиобластом R1 и T2, выделенные из опухолей пациентов с подтвержденным диагнозом «глиобластома», которые можно использовать в качестве модельных объектов в дальнейших исследованиях.

Действие ионизирующего излучения или фотемустина на линии глиобластом, не экспрессирующих нейрональные маркеры (CD56 и CD133), может приводить к формированию резистентных клеток, характеризующихся активацией генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса, влияющих на прогрессию опухолей (HGF, VEGF, TNC и других), а также белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения. Изучение ответа глиобластом, обладающих разным уровнем экспрессии нейрональных маркеров, на действие химиопрепаратов и облучения требует дополнительных исследований на большем количестве клеточных линий. Нейрональные маркеры CD56 и CD133 могут быть рассмотрены как потенциальные маркеры прогноза ответа опухоли на действие облучения или фотемустина.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач были использованы культуральные, морфологические и иммуноцитохимические методы, проточная цитофлуорометрия, ПЦР в режиме реального времени. В качестве материала исследования использовали культуры клеточных линий глиобластом человека. Клеточные культуры подвергали действию фотонного пучка на линейном ускорителе Elekta Precise Treatment System™. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.0.

Положения, выносимые на защиту:

1. Линии глиобластом характеризуются гетерогенностью и разной реакцией на действие химиопрепаратов и облучения. Действие ионизирующей радиации или ФМ в высоких дозах на одни линии глиобластом (A172 и R1) приводит к гибели клеточных культур, в других линиях (T98G и T2) выявляются резистентные непродливающиеся переживающие клетки.

2. В линиях глиобластом, которые исходно содержат популяции клеток, позитивных по нейрональным маркерам CD56 и CD133/2 (A172 и R1), после действия облучения или ФМ в сублетальных дозах отмечается снижение активности генов ряда ростовых факторов и белков внеклеточного матрикса. Это снижение наиболее выражено для генов *HGF*, *TGFβ1* и *TNC*.

3. В линиях глиобластом, которые не содержат популяции клеток, экспрессирующих нейрональные маркеры CD56 и CD133/2 (T98G и T2), после действия облучения или ФМ

происходит увеличение активности генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса, а также генов белков, связанных с мезенхимным фенотипом. Максимальная активация выявлена для генов *HGF*, *TNC* и *FAP*.

4. В резистентных переживающих клетках глиобластом, выявленных после генотоксических воздействий, отмечается высокая экспрессия генов, кодирующих факторы, влияющие на прогрессию опухолей: *HGF*, *TNC*, *VEGF*, *EGF*, *FGF2(b)*, *THBS1*.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов основана на использовании современных методов исследования, адекватных поставленным задачам, статистической обработке результатов экспериментов. Материалы работы были представлены на 10-й конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения-2014», Санкт-Петербург (Санкт-Петербург, 2015 г.); I Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2015 г., постер); конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, 2015 г.); II Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2016 г.); VI Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2020» (Санкт-Петербург, 2020 г.).

Публикации по теме работы

По материалам диссертации опубликовано 9 работ: 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и индексируемых Scopus, а также 5 тезисов докладов на международных и отечественных конференциях.

Личный вклад автора в проведение исследования

Культивирование клеток, все экспериментальные части работы, морфологические исследования и проточная цитометрия были выполнены автором лично. Исследование проб методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени проводила Н. Л. Вартамян. Материалы, вошедшие в данную работу, обсуждались с соавторами и научным руководителем.

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа содержит 18 таблиц и 19 рисунков. Библиографический указатель включает 151 публикацию на русском и английском языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гистологическое происхождение и классификация глиом

Глиомы – группа опухолей головного мозга, имеющих глиальное происхождение. Система их классификации, принятая ВОЗ в 2016 году, по сравнению с предыдущей 2007 года, основана не только на гистологической характеристике опухоли, но и включает молекулярные параметры [Louis D.N. et al., 2016].

Глиальные опухоли разделяют на следующие основные гистологические типы: астроцитарные, эпендимные, олигодендроглиальные, а также смешанного типа. В зависимости от присутствия в опухоли признаков малигнизации глиомы каждого гистологического типа делят по степени злокачественности. Выделяют глиомы низкой и высокой степеней злокачественности. К глиомам низкой степени злокачественности (grade I–II) относят диффузную астроцитому, пилоидную астроцитому, субэпендимарную гигантоклеточную астроцитому, плеоморфную ксантоастроцитому и олигодендроглиому, которые представляют собой высокодифференцированные глиомы. К глиомам высокой степени злокачественности (grade III–IV) относят анапластическую астроцитому, анапластическую олигодендроглиому, анапластическую плеоморфную ксантоастроцитому, глиобластому.

Астроцитомы, анапластические астроцитомы, глиобластомы в зависимости от наличия мутаций изоцитратдегидрогеназы (IDH) разделяют на опухоли с мутацией IDH (IDH mutant) и без мутации (IDH wild type). Для классификации олигодендроглиом и анапластических олигодендроглиом используют наличие мутации IDH и делеции 1p/19q.

Глиобластомы являются самыми распространенными опухолями центральной нервной системы и классифицируются как IV степень злокачественности. В соответствии с гистопатоморфологической классификацией глиобластомы относят к астроцитарному ряду. Глиобластомы разделяют на два типа: первичные и вторичные. Первичными считают глиобластомы, выявленные впервые без каких-либо свидетельств ранее предшествующей опухоли с низкой степенью злокачественности, к ним относят большинство глиобластом. Такие глиобластомы выявляют в основном у пожилых пациентов. Вторичные глиобластомы образуются путем прогрессии астроцитом более низких степеней злокачественности (grade II и III), встречаются у молодых пациентов и ассоциированы с лучшим прогнозом. Эти два типа глиобластом практически не различимы по гистологии, но обладают различными генетическими и эпигенетическими профилями [Gusyatiner O., Hegi M.E. et al., 2018].

1.2. Гетерогенность глиобластом

1.2.1. Морфологическая характеристика

Глиобластомы – гетерогенная группа опухолей, различающихся по морфологии, фенотипическим и генетическим характеристикам. Кроме того, каждая глиобластома сформирована гетерогенными клеточными популяциями.

Патоморфологическая оценка глиобластом включает оценку размеров, формы клеток, количества ядер и других параметров. Для глиобластом характерен клеточный полиморфизм, в опухолях отмечают клетки отростчатой, астроцитоподобной, полигональной, фибробластоподобной формы.

Подтверждение гистологического типа глиом проводится с помощью иммуногистохимического определения характерных для глиальных клеток белка S100 и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), маркера высокодифференцированных глиом. Определяют также такие маркеры как виментин, характерный для клеток мезенхимального происхождения, нейтральный маркер β -тубулин III. Экспрессия β -тубулина III в глиомах высокой степени злокачественности выше по сравнению с низко злокачественными глиомами [Jayakrishnan C.P. et al., 2019]. Кроме того, в опухолях головного мозга оценивают присутствие цитокератинов (белки промежуточных филаментов эпителиальных клеток), основного белка миелина (MBP), а также белка онкосупрессора p53, мутация гена которого является одним из неблагоприятных прогностических маркеров глиом [Колотов К.А. и др., 2012].

1.2.2. Фенотип клеток глиобластом

Поверхностные молекулы глиобластом обеспечивают взаимодействие между клетками и их микроокружением и отвечают, как за межклеточное взаимодействие, так и взаимодействие с внеклеточным матриксом. Фенотип клеток глиобластом отличается как среди разных опухолей глиобластом, так и в пределах одной опухоли. Клеткам глиобластом свойственны поверхностные маркеры, характерные для клеток нейрального и мезенхимального происхождения. К мезенхимным маркерам относят CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 и другие, к нейрональным – CD56 и CD133.

Рецептором, отвечающим за адгезию клеток и взаимодействие клеток с такими компонентами внеклеточного матрикса, как остеопонтин и гиалуроновая кислота, является молекула клеточной адгезии и трансмембранный рецептор CD44 [Skandalis S.S. et al., 2019; Fnu G. et al., 2021]. Эта молекула вовлечена в разнообразные межклеточные взаимодействия и патологические процессы [Chen C. et al., 2018]. В результате альтернативного сплайсинга и посттрансляционных модификаций (N-гликозилирование, O-гликозилирование, взаимодействия с гепаран или хондроитинсульфатами) может образовываться более 100 изоформ CD44, каждая из которых обладает определенной специфичностью и обеспечивает взаимодействие с различными компонентами межклеточного матрикса (коллагеном,

фибронектином, ламинином, селектинами, матриксными металлопротеиназами (ММР) и другими) [Senbanjo L.T. et al., 2017]. CD44, взаимодействуя с компонентами межклеточного матрикса, способствует миграции и инвазии клеток, кроме того, действует как сенсор для активации или остановки клеточного роста. CD44 регулирует ряд центральных сигнальных путей, включая PI3K/АКТ, малых GТФаз, Ras и MARK [Ouhtit A. et al., 2018]. Предполагают, что маркер CD44 характеризует популяции стволовых клеток в большинстве опухолевых тканей [Wang L. et al., 2018]. В нормальных тканях мозга CD44 не экспрессируется или экспрессируется слабо, в то время как реактивные астроциты и клетки астроцитом в разной степени экспрессируют этот маркер. Высокая экспрессия CD44 является маркером плохого прогноза и радиорезистентности глиом [Dong Q. et al., 2019; Mihic J. et al., 2019; Liu W.H. et al., 2020; Si D. et al., 2020; Wu G. et al., 2020].

Большую группу молекул клеточной адгезии, взаимодействующих с внеклеточным матриксом и участвующих в развитии инвазивного роста опухолей, составляют интегрины. Интегриновые рецепторы участвуют во многих функциональных процессах, включая пролиферацию, адгезию и инвазию, взаимодействуя с широким спектром адгезионных молекул (VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 и другими). Представляют собой гетеродимеры, образуемые из одной α и одной β субъединицы (всего отмечено 18 α и 8 β субъединиц), в комплексе с разными α субъединицами $\beta 1$ связывается с различными компонентами внеклеточного матрикса: коллагенами, ламининами, с фибронектином, витронектином, тенасцином С, остеопонтином. Облучение нескольких клеточных линий (в том числе глиобластомы A172) в дозах 2–6 Гр приводило к увеличению экспрессии $\beta 1$ -интегрин на поверхности клеток. Интегрин опосредованная адгезия к белкам внеклеточного матрикса (фибронектину, коллагену III) придавала устойчивость к радиационному воздействию. Было показано, что $\beta 1$ -интегрин является критическим регулятором выживаемости клеток после радиационного повреждения, включая PI3K/АКТ сигнальный путь [Cordes N., et al., 2006].

Одной из поверхностных молекул, обладающей фосфатазной активностью, является мембранный фермент экто-5'нуклеотидаза (CD73). Эта молекула встроена в клеточную мембрану за счет остатков гликозилфосфатидилинозитола. АТФ существует в клетке в высоких концентрациях, где участвует в энергетическом метаболизме, во внеклеточном пространстве концентрация АТФ очень низка. Повышение концентрации АТФ во внеклеточном пространстве может происходить во время повреждения тканей, при воспалении и гипоксии. Сначала преобразование АТФ/АДФ в АМФ выполняет эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1 (CD39), затем экто-5'нуклеотидаза дефосфорилирует внеклеточный АМФ до аденозина, который, в свою очередь, оказывает влияние на клетки микроокружения. Передача сигналов эктонуклеотидаз, баланс между АТФ/АДФ, АМФ и аденозином является важным в контроле

развития опухоли. Исследование действия внеклеточного аденозина на клетки линии глиобластомы U343MG показало, что при высоких концентрациях он способен стимулировать экспрессию генов Snail и ZEB1, которые регулируют процесс эпителиально-мезенхимального перехода [Pietrobono D. et al., 2020]. Активность CD73 играет роль в регулировании экспрессии и активности MRP1 (важного ABC-транспортера в развитии множественной лекарственной устойчивости) и влияет на устойчивость клеток глиобластом к средствам противоопухолевой терапии. Ингибирование передачи сигналов аденозинового рецептора A_{2b} снижает экспрессию белка-транспортера множественной лекарственной устойчивости, включая гликопротеин проницаемости (P-gp) и MRP1 [Yan A. et al., 2019]. Снижение экспрессии CD73 приводило к значительному подавлению жизнеспособности, пролиферации и клоногенности стволовых клеток глиобластом, тогда как снижение ферментативной активности CD73 оказывало отрицательное воздействие только на инвазию клеток с нарушением передачи сигналов от аденозина [Tsiampali J. et al., 2020].

Еще одним поверхностным гликозилфосфатидилинозитол-связанным гликопротеином является CD90 (Thy-1). Этот маркер содержит небольшой домен, относящийся к иммуноглобулиновому суперсемейству. CD90 исходно был обнаружен на мышинных Т-клетках. CD90 участвует в ряде физиологических и патологических процессов, взаимодействует с такими лигандами, как интегрины $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{x}\beta 2$, синдекан-4. В нервной системе CD90 проявляется в регуляции роста аксонов и регенерации нервов. Исследование 15 глиобластом, 19 астроцитом (III степень злокачественности), 13 астроцитом (II степени), 3 астроцитомы (I степени) и 8 образцов нормальной мозговой ткани, выполненное J. He с соавторами, показало, что CD90 высоко экспрессирован в глиобластомах и анапластических астроцитах (степень злокачественности III) и слабо обнаруживается в глиомах низкой степени злокачественности и нормальном мозге. Выделенные клетки глиобластом, экспрессирующие CD90 (как CD133+, так и CD133-), обладали более высокой способностью к образованию нейросфер, чем клетки не экспрессирующие CD133 и CD90 [He J. et al., 2012]. CD90 экспрессируется не только на стволовых клетках глиобластом, но также и на более дифференцированных опухолевых клетках. В клетках глиобластом показана корреляция между экспрессией CD90 и сигнатурами генов, связанных с адгезией и миграцией. CD90 связанная миграция зависела от активации SRC и FAK сигналинга в клеточных моделях глиобластом и образцах глиобластом пациентов, а ингибирование этих сигнальных путей снижало инвазивные свойства CD90 позитивных клеток [Avril T. et al., 2017].

CD105 – мембранный гликопротеин, характерен для мезенхимных стволовых клеток, является маркером эндотелия, участвует в различных этапах ангиогенеза (пролиферации, миграции и адгезии эндотелиальных клеток) и рассматривается в качестве терапевтической

цели в опухоль-ассоциированных сосудах. CD105 представляет собой эндоглин, входит в состав рецепторного комплекса TGF β , модулирует передачу сигналов от TGF β 1, TGF β 3 и других факторов (активина А и костных морфогенетических белков). В глиобластомах экспрессия эндоглина выражена как в сосудах, так и опухолевых клетках. Между глиобластомами отмечена высокая вариабельность экспрессии этого маркера [Burghardt I. et al., 2021]. Мембраносвязанная форма CD105 может подвергаться протеолитическому действию при помощи MMP-14, образуя растворимые формы эндоглина. Снижение уровня мембраносвязанного CD105 и увеличение растворимой формы является неблагоприятным прогностическим признаком при некоторых солидных опухолях, например, при раке простаты [Vidal A.C. et al., 2020].

CD146 (MCAM) – молекула клеточной адгезии, первоначально была идентифицирована как маркер меланомы, экспрессируется на эндотелии, участвует в миграции эндотелиальных клеток, ангиогенезе, известна как маркер мезенхимных стволовых клеток. Эта молекула обладает широкими функциями, является посредником в развитии клеточной миграции и инвазии. Исследования глиом показали, что экспрессия CD146 значительно повышена в глиомах III и IV степеней злокачественности. Экспрессия этого маркера отмечена в большей степени на клетках глиобластом в фазах G2+M и положительно коррелирует с экспрессией CD133 [Yawata T. et al., 2019]. Роль CD146 при опухолевом росте до конца не изучена. CD146 является мишенью для передачи сигналов CD44. Активация CD44 приводит к снижению экспрессии CD146 на поверхности клеток, увеличению растворимой формы CD146 за счет увеличения активности MMP [Ouhtit A. et al., 2018].

Гомеостаз ткани и перестройка внеклеточного матрикса в большой степени зависит от контроля протеолитических событий. В этом процессе важны как межклеточные взаимодействия, так и взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом, поскольку клетки могут инициировать сигналы, активируя протеолитические каскады. Инвазивный рост опухоли обычно сопровождается активацией MMP и протеолизом матриксных белков. Индуктором MMP является CD147 (базигин), который по своей функции получил название EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer). Эта молекула представляет собой трансмембранный гликопротеин и относится к иммуноглобулиновому суперсемейству. Обладает способностью стимулировать выработку некоторых MMP, включая MMP-2, MMP-9, MMP-14, MMP-15. Молекула CD147 участвует в инвазии опухоли, способствуя увеличению продукции MMP опухоль ассоциированными фибробластами и деградации внеклеточного матрикса. CD147 предлагают, как прогностический маркер у пациентов с глиобластомами. В глиобластомах экспрессия CD147 значительно выше по сравнению с тканями нормального

головного мозга и степень экспрессии этого маркера коррелирует со степенью злокачественности. [Li H. et al., 2017].

В исследовании N.W. Colangelo и соавторов облучение клеточных линий глиобластом T98G и U87MG в дозах до 8 Гр приводило к увеличению содержания CD147 в экзосомах, выделяемых клетками этих линий. Поглощение экзосом клетками культуры астроцитов приводило к увеличению синтеза MMP-9. Этот эффект усиливался, если клетки глиобластом были облучены. Нокдаун CD147 препятствовал усилению JNK-сигналинга и повышению уровня секретируемой активной формы MMP-9 в клетках глиобластом [Colangelo N.W. et al., 2020]. Таким образом, микроокружение опухоли через взаимодействие с CD147 и секрецию MMP может оказывать влияние на инвазивность глиобластом, а облучение способствовать усилению этого эффекта.

В регуляцию инвазии и прогрессию глиобластом может быть вовлечена молекула CD166 (молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов, ALCAM). ALCAM действует как сенсор клеточной плотности и контролирует переход от локальной клеточной пролиферации к инвазии, участвует в активации каскада металлопротеиназ в ответ на межклеточное взаимодействие и взаимодействие с межклеточным матриксом [von Lersner A. et al., 2019]. Молекула CD166 – трансмембранный гликопротеин, член иммуноглобулинового суперсемейства, является маркером мезенхимных стволовых клеток, экспрессируется во многих типах нормальных и опухолевых клеток является маркером плохого прогноза при колоректальном раке [Han S. et al., 2017].

В качестве прогностического маркера глиобластом, рассматривают молекулу CD151 (PETA-3 или SFA-1. Эта молекула относится к семейству тетраспанинов, взаимодействует с интегринами $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ и $\alpha 6\beta 4$, вовлечена в процессы адгезии, клеточной миграции и инвазии [Erfani S. et al., 2021]. Подавление экспрессии CD151 ингибирует способность клеток к формированию нейросфер, пролиферацию, миграцию клеток, приводит к снижению экспрессии маркеров, характерных для стволовых клеток (SOX2, OLIG2). Экспрессия CD151 способствует самообновлению нейросфер, миграции клеток и экспрессии факторов транскрипции, связанных со стволовостью [Tilghman J. et al., 2016].

CD56 – нейральная молекула клеточной адгезии (NCAM1), гликопротеин, относится к иммуноглобулиновому суперсемейству, экспрессируется на поверхности нейронов, нейроглии, натуральных киллеров, играет центральную роль в нейрогенезе, нейронной миграции и росте невритов. Экспрессируется на клетках меланомы, глиом и других опухолей. NCAM представлена в нескольких изоформах [Jayaram S. et al., 2018]. Опосредованная NCAM передача сигналов может быть активирована и связана с широким спектром молекул. Эта молекула

участвует в пролиферации, межклеточном взаимодействии и клеточной мобильности [Li J. et al., 2020].

CD133 – трансмембранный гликопротеин, известный как проминин-1, является членом пентаспанинов. CD133 экспрессируется в различных нормальных и опухолевых клетках, и является маркером нейральных стволовых клеток. Этот маркер может быть экспрессирован на стволовых клетках глиобластом, но не является идентифицирующим эту популяцию клеток. Стволовые клетки глиобластом, как и нейральные стволовые клетки, концентрируются вокруг кровеносных сосудов в васкулярных нишах, где, взаимодействуя с клетками микроокружения, получают быстрый доступ к различным регуляторным факторам и способность к миграции. Эндотелиальные клетки ниши способствуют самовоспроизведению стволовых клеток и препятствуют их дифференцировке. Было показано, что стволовые клетки в васкулярных нишах экспрессируют CD133, Sox2 и нестин, характеризуются низким уровнем экспрессии эндотелиальных маркеров и низким пролиферативным индексом. В тоже время среди отдельных клеток в глиобластомах отмечены CD133 позитивные клетки, экспрессирующие эндотелиальные маркеры CD31 (PECAM) и CD34, и обладающие высоким уровнем пролиферации [Christensen K. et al., 2011]. Предполагают, что стволовые клетки глиобластом могут принимать участие в развитии неоангиогенеза, или васкулогенной мимикрии. Было показано, что клетки, коэкспрессирующие глиальный маркер GFAP и эндотелиальные маркеры CD34 или CD31, были обнаружены в 46,9% клинических образцов глиобластомы, среди которых в 70% случаев такие клетки формировали сосудистые структуры [Mei X. et al., 2017].

Таким образом, клетки глиобластом экспрессируют мезенхимные, нейрональные и эндотелиальные маркеры. Маркеры CD44, CD147, CD151 ассоциированы со злокачественностью глиом. В качестве поверхностных маркеров стволовых клеток глиобластом в основном рассматривают маркеры CD44 и CD133.

1.2.3. Стволовые клетки глиобластом

В настоящее время рассматривают две основные теории развития опухолей: стохастическую и иерархическую. Согласно стохастической модели опухолевые клетки гетерогенны, но потенциально каждая из них может быть клоногенной и инициировать развитие опухоли. В этом случае опухолевая прогрессия осуществляется за счет конкуренции клонов. В соответствии с другой, иерархической теорией, опухоль развивается из небольшой популяции стволовых клеток, которые поддерживают рост и прогрессию опухоли [Carvalho L.S. et al., 2021].

Стволовые клетки глиобластом обладают эффективной ДНК репарацией и устойчивостью к апоптозу [Annovazzi L. et al., 2017]. Эта устойчивость может достигаться

высокой экспрессией репарирующего фермента MGMT, белков множественной лекарственной устойчивости MDR1 и BCRP1 [Shimura T. et al., 2012]. Благодаря низкой скорости пролиферации и удлинённому клеточному циклу, во время остановки которого проходят процессы репарации ДНК, стволовые клетки более устойчивы к действию терапии, чем быстро пролиферирующие клетки.

Исследования по поиску маркеров, способных идентифицировать опухолевые стволовые клетки продолжаются и в настоящее время. В глиобластомах панель идентифицирующих маркеров для стволовых клеток до сих пор не определена. Для стволовых клеток глиобластом характерны маркеры нейральных стволовых клеток CD133 и нестин, а также CD90 и CD44. В этих клетках активны гены *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, Musashi-1 (*MSH1*), *BMI1* [Guo Y. et al., 2011; Iwadata Y. et al., 2018; Lin J.C. et al., 2018; Ishii H. et al., 2021]. Кроме того, стволовые клетки глиобластом экспрессируют маркеры A2B5, CD15, CD56, CD24 [Balik V. et al., 2009; Soeda A. et al., 2014]. Однако профили экспрессии указанных поверхностных маркеров различаются в глиобластомах [Soeda A. et al., 2014; Behnan J. et al., 2017; Dirkse A. et al., 2019].

Стволовые клетки злокачественных глиом были впервые описаны как популяция CD133 позитивных клеток. Эти клетки обладали способностью к самовозобновлению, образованию нейросфер, состоящих из клонально воспроизводимых клеток и были способны к инициации опухоли при трансплантации иммунодефицитным мышам [Singh S.K. et al., 2003]. Последующие исследования показали, что CD133 не всегда характеризует популяцию стволовых клеток в глиобластомах. Н. S. Gunther и соавторы исследовали девять клеточных линий глиобластом, выделенных из опухолей пациентов [Gunther H.S. et al., 2008]. Эти клеточные линии можно было разделить на два типа по профилю экспрессии нейральных маркеров и различным клеточным характеристикам. Клеточные линии первого типа экспрессировали паттерн генов нейрального развития, образовывали нейросферы, экспрессировали CD133, и показали мультипотентный профиль дифференцировки в сторону нейрональной, астроглиальной и олигодендроглиальной линий, а также вызывали активный рост опухоли *in vivo*. Для другого типа клеточных линий была характерна экспрессия генов, связанных с внеклеточным матриксом, эти клетки слабо экспрессировали или не экспрессировали CD133, обладали адгезивностью *in vitro* и показали слабый онкогенный потенциал *in vivo*. Было сделано предположение, что в гетерогенных глиобластомах существует несколько типов стволовых клеток, которые обладают разными клеточными и молекулярными характеристиками.

Т. Denisenko с соавторами описали два типа опухолевых стволовых клеток глиобластом. Нейральный тип характеризовался быстрым образованием нейросфероподобных агрегатов с высоким уровнем пролиферации. Клеточные линии, слабо экспрессирующие маркер CD133,

также были способны формировать нейросферы, но обладали низким уровнем пролиферации. Эти клетки обладали высоким уровнем пролиферации в среде с сывороткой и были способны к дифференцировке (остеогенной и хондрогенной) в мезенхимальные клеточные типы [Denisenko T. et al., 2014].

Наблюдения за тем, что гистологически идентичные опухоли отличаются по клиническому течению и по устойчивости к воздействию терапии, привели к исследованиям транскрипционных профилей глиобластом. Глиобластомы отличаются по профилю экспрессии генов и этот профиль отражает их клиническое поведение. Согласно профилю генной экспрессии и наличию специфических маркеров глиобластомы разделяют на четыре подтипа: классический, пронеуральный, нейральный и мезенхимальный [Verhaak R.G. et al., 2010]. Опухоли пронеурального подтипа характеризуются относительно благоприятным прогнозом, наиболее агрессивное течение свойственно мезенхимальному варианту. Молекулярные сигнатуры, определяющие принадлежность к тому или иному подтипу глиобластом, не являются фиксированными и могут изменяться. Н. S. Phillips и соавторы сравнивали специфические маркеры в первичных астроцитомах и при их рецидивировании у одних и тех же больных. В 8 из 26 исследуемых астроцитов подтип изменился, при этом наблюдался сдвиг от пронеурального подтипа в сторону мезенхимального [Phillips H.S. et al., 2006]. Такое изменение подтипа в глиобластомах было названо пронеурально-мезенхимальным переходом [Fedele M. et al., 2019]. Мезенхимальный профиль экспрессии генов ассоциирован с генами, связанными с агрессивностью и инвазивностью, и определяет наиболее плохой прогноз при глиобластоме.

Уровни экспрессии маркеров CD44 и CD133 являются уникальными для каждой глиобластомы. D.V. Brown и коллеги отмечали корреляцию маркера CD133 с активной пролиферацией клеток, а CD44 – с инвазивными свойствами клеток глиобластом, что напоминало пронеуральный и мезенхимальный подтипы. В работе было показано, что действие гипоксии приводило к снижению доли клеток, экспрессирующих CD44, тогда как доля клеток, позитивных по CD133 увеличивалась. В зависимости от экспрессии этих маркеров отмечались изменения в характере роста глиобластом. Ксенотрансплантаты опухолей человека в мышах, полученные из CD44 позитивных клеток, демонстрировали инвазивный рост, а из CD133 позитивных – ограниченный рост. Двойные позитивные клетки (CD44+CD133+) лучше образовывали сфероиды и проявляли высокий клоногенный потенциал при культивировании *in vitro* [Brown D.V. et al., 2017]. Действие химиопрепарата темозоломид приводило к снижению доли клеток, экспрессирующих CD133, и увеличению доли CD44 позитивных клеток [Brown D.V. et al., 2017; Wang H. H. et al., 2017a]. По мнению D.V. Brown и соавторов, изменение соотношения «пролиферирующих» и «инвазивных» клеток имеет много общего с

эпителиально-мезенхимальным переходом. Однако это изменение фенотипа опухолевых клеток является динамическим процессом, в отличие от исходного состояния, описанного как молекулярный подтип глиобластом.

М. Nishikawa и соавторы показали, что сильная гипоксия (1% O₂) способствует повышению экспрессии CD44 через активацию HIF-1 α , приводя к формированию очень агрессивной опухоли. В то время как умеренная гипоксия (5% O₂) способствует повышению экспрессии остеопонтина через активацию HIF-2 α и снижению CD44-опосредованной миграции и инвазии клеток глиобластом. В результате происходит формирование менее инвазивной быстро пролиферирующей опухоли [Nishikawa M. et al., 2021].

В клеточных линиях глиобластом крысы C6 и человека U87 блокирование экспрессии CD44 приводило к увеличению экспрессии генов нестина, CD133, NANOG, OCT4 [Wang H. N. et al., 2017b]. Такие клетки лучше образовывали нейросферы и обладали способностью к долгосрочной пролиферации.

А. Dirkse и соавторы предположили, что фенотипическая гетерогенность в глиобластомах возникает в результате обратимых переходных состояний. Исследование фенотипа клеток глиобластом проводили по маркерам CD133, CD44, CD15, A2B2 в линиях, полученных из опухолей пациентов. Все субпопуляции, отсортированные с помощью FACS, могли самообновляться в течение нескольких пассажей без существенного различия с аналогичной скоростью, то есть фенотипически гетерогенные клетки обладали свойствами стволовых клеток *in vitro*. Исследование распределения популяций по фазам клеточного цикла показало, что доля клеток CD133-CD44- в фазах S и G2/M была ниже. Это может свидетельствовать о колебаниях экспрессии CD133 на протяжении клеточного цикла [Dirkse A. et al., 2019].

У авторов возник вопрос насколько фенотипическая гетерогенность зависит от микроокружения и приводит ли изменение внешних условий к отбору или адаптации фенотипических состояний. Гипоксия – характерная черта глиобластом. Считается, что гипоксия приводит к обогащению популяции стволовых клеток [Soeda A. et al., 2009; Zeng F. et al., 2018], однако оставалось неясным являлись ли такие фенотипические сдвиги результатом отбора стволовых клеток из существующей популяции или фенотипической адаптацией. Воздействие гипоксии приводило к явному сдвигу в фенотипе. Например, после действия гипоксии в линии NCH644 доля популяций, позитивных по маркерам CD133, CD44 и A2B5 была выше, а доля CD15 позитивных – снижена. Результаты исследования показали, что фенотипический сдвиг при гипоксии (<0,5% O₂) происходил в большей мере через адаптацию существующих клеток, индуцированные фенотипические адаптации были обратимы. Хотя все клеточные популяции обладали свойствами стволовых клеток и обладали онкогенным

потенциалом, были отмечены различия в скорости пластичности, что коррелировало с развитием опухоли *in vivo*. Авторы считают, что высокий онкогенный потенциал может быть связан с быстро адаптирующимися клетками с высокой внутриопухолевой фенотипической гетерогенностью, которые могут участвовать в создании ниш, способствующих росту опухоли [Dirkse A. et al., 2019].

Таким образом, влияние внешних факторов, таких как уровень гипоксии или действие химиопрепаратов может приводить к изменениям соотношения клеточных популяций и фенотипа клеток, инициирующих рост глиобластом, и влиять на характер роста и скорость прогрессии опухолей. Маркеры CD44 и CD133 рассматривают как мишени, которые можно было бы использовать при лечении глиобластом [Иванова А.Е., Чумаков С.П., 2020].

1.3. Действие препаратов хлорэтилнитрозомочевины и ионизирующего излучения на клетки

Для лечения глиобластом используют хирургическое удаление опухоли, лучевую и противоопухолевую лекарственную терапию.

Химиотерапевтические препараты, используемые при лечении глиобластом, включают соединения нитрозомочевины (ломустин, нимустин, кармустин, фотемустин), которые относятся к алкилирующим препаратам и обладают способностью проходить гематоэнцефалический барьер.

В физиологических условиях соединения хлорэтилнитрозомочевины расщепляются на ряд метаболитов с образованием алкилирующего 2-хлорэтил карбониевого иона. Этот реактивный ион алкилирует гуанин преимущественно в положении N7. Алкилирование азота в ДНК приводит к образованию хлорэтил-аминогрупп на нуклеотидах, которые после дегалогенирования (отсоединения хлора) могут пройти второе алкилирование. Алкилирование 2-хлорэтил карбониевых ионов может также происходить по Об-гуанину с образованием Об-хлорэтилгуанина [Ludlum D.B. et al., 1997].

Фотемустин ((±)-диэтил-[1-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]этил]фосфонат) – препарат третьего поколения из группы хлорэтилнитрозомочевины. Алкилирующее действие фотемустина (ФМ) связано с образованием Об-хлорэтилгуанина, который является нестабильным и подвергается внутримолекулярной перегруппировке, ведущей к образованию N1-Об-этенугуанина и затем образованию N1-гуанин-N3-цитозин межцепочных перекрестных связей. В отличие от других соединений нитрозомочевины ФМ образует меньше разрывов ДНК и больше сшивок ДНК-ДНК или ДНК-белок. Наличие в химической структуре ФМ биоизомера аланина (амино-1-этилфосфоновой кислоты) облегчает проникновение препарата в клетки. Период полувыведения ФМ составляет 29 мин [Beauchesne P., 2012]. На сегодняшний момент

ФМ рассматривается как препарат выбора второй линии при рецидивирующих злокачественных глиомах [Marinelli A. et al., 2018].

Устойчивость клеток к нитрозомочевине может быть связана с эффективной ДНК репарацией и деятельностью Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) [Nikolova T. et al., 2017]. Этот репарирующий фермент, перенося алкильные группы с Об-положения гуанина, предотвращает образование вторичных внутринитевых сшивок ДНК. Клетки с отсутствием экспрессии MGMT более чувствительны к действию нитрозомочевины (кармустина) [Bandres E. et al., 2005].

В исследовании действия кармустина на клеточные линии глиобластом A172 и GBM2 было показано, что в популяциях резистентных клеток отмечалась активация сигнальных путей ERK1/2 и АКТ. Такие клетки были устойчивы к повторному воздействию препарата. Резистентные популяции характеризовались снижением экспрессии CD90, и более высоким уровнем экспрессии CD133 [Kang M.K. et al., 2007]. М. К. Kang и соавторы связывали эти изменения со «стволовым» фенотипом резистентных клеток.

Препараты нитрозомочевины могут изменять экспрессионный профиль в опухолевых клетках глиобластом. Так, в работе E. Bandres и соавторов было показано, что под воздействием кармустина в клетках линий A172 и T98G изменялась экспрессия генов, связанных с репарацией, апоптозом и транскрипцией [Bandres E. et al., 2005]. Было установлено, что этот эффект связан с усилением экспрессии SMARCD1, относящегося к семейству SWI/SNF белков (BRG1-ассоциированный фактор), которые регулируют транскрипционную активность генов, ремодулируя структуру хроматина в локусе гена. Авторы делают вывод, что в клетках линий глиобластом, вне зависимости от экспрессии MGMT, после действия кармустина происходит изменение экспрессии ряда генов, связанных с клеточным циклом и выживанием.

В качестве другого фактора воздействия на клетки глиобластом используют ионизирующее излучение. Стандартным режимом лучевой терапии служит фракционированное облучение по 2,0 Гр на фракцию с суммарной очаговой дозой 60 Гр, подведенных за 6 недель. Ионизирующее излучение вызывает повреждения оснований, однонитевые и двунитевые разрывы ДНК. Для устранения повреждений ДНК в клетке инициируется «ответ на повреждение ДНК» (DDR). Этот процесс представляет собой каскад фосфорилирования сигнальных белков, следствием которого является остановка клеточного цикла, в течение которой проходят процессы репарации ДНК, а при сильных повреждениях или нарушениях системы репарации – развитие апоптоза [Abad E. et al., 2020; Ferri A. et al., 2020; Carusillo A., Mussolino C. et al., 2020].

Действие ионизирующего излучения может влиять на уровень метилирования ДНК и приводить к изменению экспрессии генов. D. A. Antwi и соавторы обнаружили, что после

облучения в клетках опухоли молочной железы MDA-MB-231 менялся уровень метилирования ряда генов, связанных апоптозом, клеточным циклом и репарацией ДНК, при этом характер изменения в статусе метилирования генов зависел от дозы облучения и менялся с течением времени. Увеличение уровня метилирования генов коррелировало с уменьшением уровня их транскрипции. В первые два часа после облучения клеток в дозе 2 Гр уровень метилирования генов повышался, при облучении в дозе 6 Гр – понижался. В дальнейшем, в период от 4 до 72 ч после воздействия в клетках, облученных в низкой дозе, уровень метилирования генов снижался, а в более высокой дозе – увеличивался. Такие изменения в уровне метилирования исследованных генов коррелировали с распределением клеток по фазам клеточного цикла. Большая часть клеток, облученных в дозе 6 Гр, через 24 ч находилась в остановке клеточного цикла – в фазе G₂/M, тогда как клетки, облученные в более низкой дозе, уже преодолевали этот блок [Antwi D.A. et al., 2013].

Фактором, определяющим реакцию опухоли на лучевое воздействие, является режим облучения. М. Н. Tsai и соавторы показали, что профиль экспрессии генов в разных опухолевых линиях, в том числе и в глиосаркоме (SF539), зависит от режима облучения. Клетки облучали однократно в дозе 10 Гр, либо многократно – 5 раз по 2 Гр. Для некоторых генов было показано усиление экспрессии при многократном облучении по сравнению с однократным. Это множественные интерферон-связанные гены (*STAT1*, *GIP2*, *OAS1*, *OAS3*, *GIP3*, *IFITM1*) и TGFβ-ассоциированные гены (*EGR1*, *VEGF*, *THBS1*, *TGFB2*) [Tsai M.H. et al., 2007].

Эффект действия повторных низких доз облучения может быть связан с изменениями в структуре хроматина. Действие облучения в низких дозах приводит к повреждениям оснований и одонитевым разрывам, которые быстро восстанавливаются. Эксцизия поврежденных оснований приводит к появлению большего количества одонитевых разрывов и деконденсации хроматина. Поскольку деконденсированный хроматин более восприимчив к действию облучения, повторное воздействие обладает еще более сильным повреждающим действием [Lavelle C. et al., 2014].

В клетках линии глиобластомы A172, обладающих «стволовым фенотипом», отмечена активация сигнальных путей, связанных с резистентностью этих клеток к облучению. Для клеток A172, полученных в результате длительного фракционированного облучения по 0,5 Гр в течение 82 дней, был характерен высокий уровень CD133 и ABC транспортеров (MDR1 и BCRP1). Такие клетки обладали радиорезистентностью и повышенной пролиферативной активностью после однократного облучения в дозе 5 Гр по сравнению с интактными клетками. В резистентных клетках отмечалась активация АКТ/cyclin D1 сигнального пути. Блокирование АКТ, cyclin D1, Cdk4 приводило к подавлению резистентности клеток [Shimura T. et al., 2012].

Таким образом, действие химиопрепаратов или ионизирующего излучения приводит к изменениям в клетках экспрессии ряда генов, связанных с клеточным циклом и выживанием. Эти изменения могут быть связаны с ремоделированием хроматина и метилированием ДНК.

1.4. Некоторые факторы прогрессии глиобластом

1.4.1. Роль ростовых факторов и микроокружения в прогрессии глиобластом

Глиобластомы представляют собой систему взаимодействий составляющих их опухолевых клеток и клеточных элементов микроокружения, а также компонентов внеклеточного матрикса. Глиобластомы отличаются изменчивостью, по мере развития в опухолях изменяется соотношение составляющих их клеточных популяций и свойства клеток. Неоднородность клеточных популяций характерна как для глиобластом, так и для клеточного микроокружения, сигналы от которого могут влиять на дифференцировку опухолевых клеток, приводить к изменению мобильности клеток. Микроокружение глиобластом включает клетки микроглии, эндотелия, нейральные стволовые клетки и другие. Стволовые клетки глиобластом, взаимодействуя с нормальными клетками головного мозга и компонентами микроокружения, могут использовать их в глиомагенезе. Микроглия, продуцирующая ростовые факторы и цитокины (трансформирующий ростовой фактор $\beta 1$ (TGF β), эпидермальный фактор роста (EGF), гепатоцитарный ростовой фактор (HGF), SDF-1), может оказывать влияние на прогрессию глиобластом.

Известно, что развитие ангиогенеза способствует прогрессии опухолей. Клетки глиобластом принимают участие в стимуляции ангиогенеза путем продукции таких ростовых факторов, как TGF β , HGF, основной фактор роста фибробластов FGF2(b), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF).

VEGF вовлечен в процесс ангиогенеза опухоли путем регуляции пролиферации и выживания эндотелиальных клеток. Сильная экспрессия VEGF связана с плохим прогнозом и плохой выживаемостью пациентов с глиомами [Shen L. et al., 2021].

HGF стимулирует пролиферацию гепатоцитов, клеток сосудистого эндотелия и опухолевых клеток. Действие HGF реализуется через взаимодействие с рецепторной тирозинкиназой c-Met [Mulcahy E.Q.X. et al., 2020]. c-Met и его лиганд HGF играют критическую роль в пролиферации, выживании, миграции, инвазии, ангиогенезе и резистентности глиобластом [Cheng F., Guo D., 2019].

EGFR – рецептор, участвующий в передаче сигналов от эпидермального фактора роста (EGF) через EGFR/PI3K/АКТ путь, является одним из самых критических элементов передачи сигналов в глиобластомах. Этот сигнальный путь регулирует такие клеточные процессы как пролиферацию, апоптоз и перестройку цитоскелета. В глиобластомах часто обнаруживают

амплификацию *EGFR* [Hovinga K.E. et al., 2019]. Аутокринная продукция EGF и FGF2(b) необходима для сохранения способности к самоподдержанию популяции стволовых клеток глиобластом [Li G. et al., 2009].

FGF2(b) играет большую роль в регуляции пролиферации, выживании, самообновлении стволовых клеток и инвазии [Jimenez-Pascual A. et al., 2020]. L. Sooman и соавторы определяли в образцах глиобластом от 97 пациентов экспрессию 11 маркеров, которые рассматривали, как прогностические. Высокий уровень FGF2(b), а также высокая экспрессия мембранного маркера CD44 наиболее достоверно коррелировали по результатам регрессионного анализа Кокса с сокращением выживаемости пациентов в пронеуральном подтипе глиобластом [Sooman L. et al., 2015].

TGF β участвует в регуляции пролиферации, дифференцировке и выживании клеток. TGF β активирует многие внутриклеточные пути, которые приводят к фосфорилированию рецептор регулируемых Smad2/3 белков, которые связываются с Smad4. Такой комплекс транслоцируется в ядро и регулирует транскрипцию многих генов [Birch J.L. et al., 2020]. Для ростового фактора TGF β характерна двойная роль в канцерогенезе. С одной стороны, этот фактор действует как сильный ингибитор пролиферации нормальных эпителиальных клеток и астроцитов, и является онкосупрессором. Однако в глиобластомах TGF β становится онкогенным фактором. TGF β 1 стимулирует экспрессию VEGF, экспрессию некоторых MMP, участвующих в ремоделировании сосудов, ангиогенезе и деградации внеклеточного матрикса. У пациентов с глиомой высокая активность TGF β сопряжена с плохим прогнозом. TGF β индуцирует способность к самообновлению и предотвращает дифференцировку стволовых клеток глиобластом [Anido J. et al., 2010].

Воздействие TGF β 1 на линию глиобластомы U87 приводило к изменению молекулярного фенотипа клеток. Под влиянием TGF β 1 в клетках U87 отмечалось усиление экспрессии 512 белков, связанных с пролиферацией, выживанием, инвазией и миграцией клеток, а также репарацией ДНК, при этом происходило подавление синтеза 123 белков, ответственных за апоптоз, взаимодействие с внеклеточным матриксом и аэробным метаболизмом [Брюховецкий И.С., 2017].

Факторами, играющими важную роль в инвазии и миграции глиальных клеток и влияющими на прогрессию глиобластом могут служить белки внеклеточного матрикса тенасцин С (TNC) и тромбоспондин-1 (THBS1) [Daubon T. et al., 2019; Zhang J.F. et al., 2019]. TNC высоко экспрессирован во всех солидных опухолях. В большинстве опухолей он продуцируется и локализуется в опухолевой строме, тогда как клетки опухоли лишены его. TNC приводит к усилению миграции опухолевых клеток, их способности к инвазии, стимуляции ангиогенеза и повышению выживаемости опухолевых клеток, метастазированию, и

индукции ЭМП [Yoneura N. et al., 2018]. При глиобластомах, наблюдается иная ситуация, в данном случае сами клетки глиобластом являются источником TNC. В глиобластомах TNC может способствовать формированию васкулогенной мимикрии через активацию пути Akt/MMP2/MMP9. В работе Н.Р. Cai и соавторов было показано, что в клеточных линиях глиобластом A172 и U251, высоко экспрессирующих TNC, отмечено формирование тубулярных структур. Воздействие TNC способствовало увеличению образования тубулярных структур в линиях U138, U373 и LNZ308 с исходно низкой экспрессией TNC. Нокдаун TNC блокировал фосфорилирование Akt и приводил к снижению экспрессии матриксных металлопротеиназ MMP2 и MMP9 [Cai H.P. et al., 2019].

THBS1 – белок внеклеточного матрикса, участвующий в регуляции адгезии, миграции и пролиферации различных типов клеток. THBS1 является важным активатором TGF β . Уровень THBS1 в глиобластомах выше, чем в глиомах II или III степеней злокачественности и нормальной ткани мозга. THBS1 – маркер, ассоциированный с мезенхимальным подтипом глиобластом. Гипометилирование или высокая экспрессия *THBS1* связаны с неблагоприятным прогнозом у пациентов с глиобластомами [Qi C. et al., 2021].

С мезенхимальным подтипом могут быть ассоциированы молекулы гладкомышечного актина $\alpha 2$ (α SMA) и белка активированных фибробластов (FAP). α SMA – это изоформа актина, которая преобладает в гладкомышечных клетках сосудов и играет важную роль в фиброгенезе. В микроокружении опухолей отмечено присутствие так называемых опухоль-ассоциированных фибробластов, которые характеризуются экспрессией виментина, десмина, FAP и α SMA.

FAP представляет собой мембранную сериновую протеазу, присутствует в эмбриональных и опухолевых тканях, а также в мезенхимных стволовых клетках адипозной, мышечной и костной тканей. Экспрессия гена *FAP* повышена в глиобластомах по сравнению с нормальным мозгом или глиомами низких степеней злокачественности. Активная экспрессия FAP отмечена в различных типах клеток микроокружения глиобластом по сравнению с нормальными тканями мозга. Высокая экспрессия FAP ассоциирована с плохим прогнозом [Ebert L.M. et al., 2020].

1.4.2. Эпителиально-мезенхимальный переход как фактор прогрессии глиобластом

Превращение эпителиальных клеток в мезенхимальные – эпителиально-мезенхимальный переход – представляет собой процесс смены клетками эпителиального фенотипа на мезенхимальный тип. Это явление, характерное для эмбриогенеза, происходит при травматических повреждениях ткани, а также при таких патологических процессах, как опухолевая прогрессия и метастазирование.

Основными признаками ЭМП считают снижение экспрессии Е-кадгерина; повышение экспрессии генов, характерных для мезенхимального фенотипа (таких как виментин, фибронектин, N-кадгерин); активация путей, связанных с реорганизацией актинового цитоскелета и увеличение клеточной подвижности. При этом происходит активация транскрипционных факторов Snail, Twist, Slug, Zeb. Эти транскрипционные факторы ингибируют промоторы генов, кодирующих белки плотных контактов (Е-кадгерин, окклюдин, клаудин-1) [Dongre A., Weinberg R.A. et al., 2019]. К индукторам ЭМП относят ростовые факторы, такие как TGF β , EGF, HGF, а также ряд молекул внеклеточного матрикса [Wang X. et al., 2017; Hao Y. et al., 2019; Yin J. et al., 2019; Huang K. et al., 2020; Bryukhovetskiy I. et al., 2020].

Поскольку глиальные клетки принадлежат к нейроэпителиальной линии, вместо термина эпителиально-мезенхимальный переход, был предложен термин глиально-мезенхимальный переход. R. Mahabir и соавторы показали, что в рецидивирующих глиобlastомах экспрессия мезенхимальных маркеров, включая виментин, фибронектин, α SMA, MMP, коллаген, CD44, YKL-40 была существенно увеличена по сравнению с образцами первичной опухоли, полученными до лечения. Повышение уровней экспрессии мезенхимальных маркеров и регуляторов ЭМП после лучевого воздействия наблюдали и в клетках линий глиобlastом KMG4 и T98G, которые в соответствии с классификацией TCGA относятся, соответственно, к proneйральному и классическому подтипу. Клетки облучали однократно в дозе 10 Гр или во фракционированном режиме в суммарной дозе 20 Гр за 10 фракций. Экспрессию мезенхимальных маркеров определяли через 48 ч и 21 день. Через 21 день после облучения было показано значительное увеличение ЭМП-связанных мезенхимальных маркеров CollA1, CollA2, α SMA, а также CD44, YKL-40 и виментина, определяющих, в соответствии с молекулярной классификацией, мезенхимальный подтип глиобlastом. Чтобы понять механизм индуцированного радиацией сдвига в сторону мезенхимального подтипа изучали такие регуляторы ЭМП, как Slug, Snail и Twist, при этом было зафиксировано повышение экспрессии Snail. ЭМП регулируется множественными сигнальными путями, которые можно разделить на две группы на основании их связи с TGF β . В случае TGF β -независимого пути, облучение вызывает появление активных форм кислорода и активирует ERK/GSK-3b/Snail сигналинг, который, определяет наблюдаемый мезенхимальный переход. Чтобы определить, принимает ли участие в пострadiационном мезенхимальном переходе TGF β -сигналинг, авторы определяли продукцию TGF β клетками глиобlastом, но не обнаружили сколько-нибудь значительного повышения его уровня в культуральной среде после облучения. Однако облучение вызывает секрецию TGF β фибробlastами и макрофагами, наблюдаемое при их сокультивировании с клетками глиобlastом. Было сделано предположение, что мезенхимальный сдвиг после облучения в клетках глиобlastом обусловлен как минимум двумя механизмами – TGF β -

зависимым путем, через микроокружение и TGF β -независимым путем через ERK1/2, GSK-3b и Snail. Через 21 день после облучения в клетках глиобластом отмечалось повышение экспрессии ассоциированных со стволовыми клетками генов *Sox2*, *Oct3/4*, *Nanog*, причем нокдаун гена *Snail* отменял этот процесс. В результате был сделан вывод, что клетки глиобластом после воздействия ионизирующего излучения подвергаются глиально-мезенхимальному переходу посредством усиления активности транскрипционного фактора Snail через механизм активации облучением ERK1/2 и последующей инактивации GSK-3b, а также через активацию Smad2/3, индуцированную TGF β [Mahabir R. et al., 2014].

J.V. Joseph и соавторы изучали эффект воздействия TGF β на клетки линий U87 и U251, которые не экспрессируют или экспрессируют в незначительных количествах мезенхимальные маркеры [Joseph J.V. et al., 2014]. Было показано, что экспозиция 10 нг/мкл TGF β в течение 96 ч активирует фосфорилирование SMAD2 и ведет к изменению клеточной морфологии, придавая клеткам вытянутую и удлинённую форму. Было отмечено увеличение экспрессии мезенхимальных маркеров фибронектина и коллагена типа 5 альфа 1 (Col5A1). Обработка TGF β приводила к увеличению миграционного и инвазивного потенциала клеток. Чтобы понять механизм, лежащий в основе TGF β -индуцированного перехода, в клетках линий U87 и U251 изучали экспрессию транскрипционных факторов, связанных с ЭМТ (*Snail1*, *Snail2/Slug*, *ZEB1*, *Twist* и β -катенина). Было выявлено TGF β -зависимое повышение экспрессии *ZEB1* и β -катенина. На клеточных культурах и на мышинной модели с внутричерепным ростом клеток было показано, что мезенхимальный переход при глиобластоме ассоциирован с усилением миграционных и инвазивных свойств. Обработка клеток ингибитором TGF β сигналинга A8301, как и нокдаун *ZEB1* предотвращали появление мезенхимальных маркеров и морфологические изменения клеток.

X. Wang с соавторами показали, что EGF может индуцировать ЭМП в глиобластомах через β -катенин и PI3K/Akt. В клеточной линии U87 ингибирование β -катенина с помощью siRNA приводило к подавлению EGF-индуцированной пролиферации, инвазивности и миграции клеток, в клетках происходило снижение экспрессии индукторов ЭМП *Snail* и *Slug*, а также экспрессии мезенхимальных маркеров (N-кадгерина и MMP9), экспрессия E-кадгерина повышалась. Ингибитор сигнальных путей PI3K/Akt инактивировал ЭМП, индуцированный EGF [Wang X. et al., 2017].

Еще одним фактором, способствующим ЭМП при глиобластоме, может быть химиотерапия. С. Kubelt и соавторы изучали профиль экспрессии различных маркеров ЭМП в 17 парах образцов первичных и рецидивирующих глиобластом пациентов. В рецидивирующих опухолях по сравнению с первичными было обнаружено снижение экспрессии таких маркеров, как β -катенин, *Snail1*, *Snail2/Slug*, бигликан и *Twist1*, тогда как экспрессия *L1CAM* была

повышена. Экспрессия десмоплакина, виментина, фибронектина, TGF β 3 и его рецепторов TGF β 3R1 и TGF β 3R2 оставалась без изменений. Однако было отмечено, что в разных парах образцов были экспрессированы различные сочетания ЭМП маркеров. В результате исследования авторы сделали заключение, что ЭМП может быть вовлечен в прогрессию глиобластом и реализуется индивидуально, поскольку эти опухоли очень гетерогенны. Кроме того, на клетках глиобластомы T98G было показано, что действие темозоломида в концентрации 400 мкг/мл в течение 48 ч индуцирует экспрессию таких ЭМП маркеров, как β -катенин, виментин, десмоплакин, Snail1, Twist1, TGF β 3R1 и L1CAM. Это позволило сделать вывод, что на процесс ЭМП могут оказывать влияние химиотерапевтические препараты, используемые для лечения глиобластом [Kubelt C. et al., 2015].

1.4.3. Гигантские полиплоидные клетки

Одним из морфологических критериев опухолевой гетерогенности является присутствие в опухоли крупных полиплоидных клеток. Количество таких клеток в различных опухолях варьирует и ассоциируется со злокачественностью заболевания и неблагоприятным прогнозом. Облучение и химиопрепараты могут способствовать увеличению количества полиплоидных клеток [Kipper F.C. et al., 2018; Fei F. et al., 2019a].

Формирование гигантских клеток после действия облучения было впервые описано Т. Т. Рук и Р. И. Маркус, которые показали, что облучение клеточной линии HeLa приводило к появлению гигантских многоядерных клеток. Такие клетки теряли способность к пролиферации, но обладали метаболической активностью и сохраняли жизнеспособность в течение длительного времени [Puck, T.T., Marcus P.I., 1956].

Одной из причин, способствующих формированию гигантских полиплоидных клеток, может служить гипоксия, которая является характерной чертой солидных опухолей, связана с агрессивным течением заболевания, и кроме того способствует поддержанию популяции опухолевых стволовых клеток [Zhang S. et al., 2014; Fei F. et al., 2019c]. Другими факторами, которые могут приводить к образованию гигантских клеток, являются ионизирующее излучение и некоторые химиопрепараты [Mittal K. et al., 2017; Fei F. et al., 2019b; Lin K.C. et al., 2019; Wang X. et al., 2019; Weng C.H. et al., 2020; White-Gilbertson S. et al., 2020; Zhang Z. et al., 2021].

Е. Кавур и соавторы определили, что в составе линий глиобластом SF268 и U87MG присутствует популяция резистентных клеток, которые устойчивы к высоким дозам облучения. Мононуклеарные клетки глиобластом, подвергаясь клеточному слиянию, формировали крупные многоядерные клетки и переживали высокие дозы облучения. Действие облучения приводило к остановке клеточного цикла за счет pCdk1(Y15). Резистентные клетки

характеризовались повышением pAkt, а также увеличением экспрессии антиапоптотических генов *BIRC3*, *Bcl-xL* и генов таких цитокинов, как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкин-6 и интерлейкин-8 [Kaur E. et al., 2015].

Слияние клеток – процесс, участвующий в формировании и дифференцировке тканей, в результате которого происходит переключение клеточных программ и формируются клетки, обладающие новыми свойствами. Слияние опухолевых клеток между собой и нормальными клетками в настоящее время рассматривают как один из механизмов выживания опухолевых клеток после действия генотоксических факторов, приводящий к метастазированию и прогрессии опухолей [Dörnen J. et al., 2020; Shabo I. et al., 2020].

Опухолевые клетки могут использовать эндорепликацию, как способ выживания во время митотической катастрофы или при генотоксическом стрессе. Формирование полиплоидных клеток часто связано с нарушениями регуляции клеточного цикла и отмечается при мутациях белка p53 [Liu K. et al., 2020]. Образование гигантских полиплоидных клеток отмечено в p53 и p21 дефицитных клеточных линиях после действия облучения [Mirzayans R. et al., 2017].

Основной характеристикой гигантских полиплоидных клеток является большой размер, превышающий размер клеток исходной популяции в несколько раз и достигающий в некоторых случаях 10–20 кратного увеличения. Эти клетки могут обладать одним или несколькими гигантскими ядрами, содержащими множественное число копий ДНК.

Ранее считалось, что индукция полиплоидии приводит к остановке опухолевого роста. Однако последние исследования показали, что полиплоидные клетки долгое время могут сохранять жизнеспособность и в результате давать пролиферирующее потомство. В некоторых случаях полиплоидные клетки могут возвращаться к нормальному клеточному циклу и митозу через процесс деплоидизации генома, называемого неозисом [White-Gilbertson S. et al., 2019]. Деление клеток с высокой плоидностью может происходить в результате ассиметричного клеточного деления, расщепления, почкования, подобно процессам деления, характерным для низших эукариот [Zhang S. et al., 2016].

Длительное наблюдение за поведением полиплоидных клеток, образующихся в результате культивирования клеток линий рака яичников Heu, SKOV3 и OVCAR433 в среде, содержащей паклитаксел, препарат из группы таксанов, повреждающий митотическое веретено, позволило изучить некоторые закономерности образования и деления гигантских полиплоидных клеток. Авторы описали цикл гигантских клеток, который разделили на четыре фазы: инициация, самоподдержание, терминация и стабилизация. В результате эндорепликации в фазах инициации и самоподдержания происходило формирование полиплоидных клеток, ядра которых затем подвергались деплоидизации путем мультиполярных митозов и почкования с

образованием парадиплоидных клеток (фаза терминации). Появление популяции диплоидных клеток, которые способны делиться при помощи митоза, характеризует фазу стабилизации. Спектральное кариотипирование показало, что геном дочерних клеток, существенно отличался от генома исходных клеток и гигантских полиплоидных клеток [Niu N. et al., 2016].

Произведенные полиплоидными клетками дочерние клетки приобретали лекарственную устойчивость и мезенхимальные характеристики. Было показано, что дочерние клетки, генерированные полиплоидными клетками Heu и SKOV3, оказались более устойчивы к действию паклитаксела, чем обычные опухолевые клетки. Кроме того, эти клетки оказались резистентны не только к паклитакселу, но и к некоторым другим препаратам, например, к винкристину и карбоплатину. Полиплоидные и дочерние клетки характеризовались повышенной экспрессией цитокератина (Pan-CK), мезенхимальных маркеров виментина, фибронектина, N-кадгерина, транскрипционных факторов Snail, Slug и Twist2, регулирующих ЭМП, а также снижением экспрессии β -катенина. Морфологически также были отмечены характерные особенности ЭМП в ксенотрансплантатах. Опухоли из обычных опухолевых клеток росли быстрее, чем опухоли из дочерних клеток. Опухоли, образованные исходными клетками, имели преимущественно эпителиальную морфологию, тогда как опухоли, происходящие из дочерних клеток, имели мезенхимальный фенотип [Niu N. et al., 2017].

Сфероиды, образованные полиплоидными опухолевыми клетками, были позитивны в отношении маркеров стволовых опухолевых клеток (OCT4, NANOG, SOX2), экспрессия которых изменялась во времени и снижалась в дочерних клетках. В сфероидах, полученных из полиплоидных клеток, было отмечено снижение экспрессии эпителиального маркера цитокератина, в то время как экспрессия мезенхимального маркера фибронектина была повышена [Niu N. et al., 2017].

Было показано, что гигантские полиплоидные клетки могут способствовать прогрессии опухолей, участвуя в формировании васкулогенной мимикрии. В полиплоидных клетках было отмечено снижение E-кадгерина, увеличение N-кадгерина, виментина, и факторов Snail, Slug и Twist, связанных с ЭМП. Для дочерних клеток было характерно значительное усиление миграционной способности и инвазивных свойств [Zhang D. et al., 2017].

Таким образом, данные публикаций свидетельствуют, что образующиеся в ответ на действие стрессорных и генотоксических факторов гигантские полиплоидные клетки могут генерировать дочерние клетки, экспрессировать маркеры стволовых клеток, и приобретать черты мезенхимного фенотипа. Дочерние клетки обладают геномом, отличным от исходных и полиплоидных клеток. Таким клеткам по сравнению с исходными клетками свойственны более высокая химиорезистентность и устойчивость к апоптозу.

1.5. Линии культивируемых клеток глиобластом – модельные объекты для исследования подходов в терапии глиобластом

Первичные культуры клеток, выделенные из опухолей пациентов, представляют собой популяции, наиболее близкие к исходной ткани. Они могут быть получены путем эксплантации цельных фрагментов ткани, механическим измельчением ткани или в результате ее ферментативной дезагрегации [Шамова Т.В. и др. 2020]. Исходный клеточный состав опухоли подвергается селекции, так как некоторые клетки не адгезируют к пластику, или могут не пролиферировать в данных условиях культивирования. Кроме того, соотношение разных клеточных популяций в культуре может меняться со временем, так как быстрорастущие клетки перерастают медленно пролиферирующие типы клеток. Недостатком избирательного процесса является то, что гетерогенность и разнообразие многоклеточной опухоли теряются. В связи с этим изменяются процессы межклеточных взаимодействий. Такое изменение первичной клеточной культуры приводит к формированию клеточной линии. Клеточные линии способны обеспечить возобновляемый клеточный материал для повторных исследований. После длительного пассирования *in vitro* в результате клеточной селекции, межклеточных взаимодействий и влияния ростовых факторов свойства первичных культур, такие как клеточный полиморфизм, экспрессия GFAP и других маркеров в клеточных линиях могут меняться. Поэтому, характеристика клеточных линий является важным моментом и включает определение ростовых характеристик клеточных популяций, размера и формы клеток, степень клеточного полиморфизма, количества ядер, иммуноцитохимическое исследование внутриклеточных белков, определение поверхностного фенотипа и другие характеристики.

С середины 1960-х и до 1970-х годов J. Ponten и коллегами были получены серии клеточных линий злокачественных глиом человека. Многие из них были описаны, включая линии глиобластом U87MG, U118MG, U138MG [Ponten J., Macintyre E.H., 1968], и в настоящее время доступны в банках клеточных линий, таких как Американский банк клеточных культур (ATCC). Клеточные линии глиобластом A172 и T98G были получены в 70-х годах прошлого века. Линия A172 была выделена D. J. Giard и коллегами [Giard D.J. et al., 1973], а линия T98G является полиплоидным вариантом линии T98, полученной докторами L. Hayflick и E. A. Pfendt [Stein G.H., 1979]. В ATCC эти клеточные линии зарегистрированы как HTB-14 (U87MG), HTB-15 (U118MG), HTB-16 (U138MG), CRL-1620 (A172) и CRL-1690 (T98G). В России в коллекциях клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) и Научно-исследовательского института гриппа МЗ РФ (Санкт-Петербург) представлены линии глиобластом человека A172, T98G и U251MG.

Клеточные линии наряду с особенностями, общими для глиобластом, имеют ряд отличий (Таблица 1).

Таблица 1 — Характеристика клеточных линий глиобластом человека

	U87MG	A172	T98G	U118MG	U138MG	U373MG	U251MG
Происхождение							
Возраст	44	53	61	50	47	50	75
Пол	Ж	М	М	М	М	М	М
Туморо- генность in vivo	+	-	+	+	-	+	+
Морфоло- гия	Э	Г	Ф	СМ, ПМ	Ф, П	А, ПМ	А, ПМ
Экспрессия белков							
GFAP	-	-	-	-	-	+	+
Виментин	+	+	+	+	+	+	+
MGMT	-	-	+	+	+	-	-
Экспрессия генов							
<i>EGFR</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>p53</i>	WT	WT	мутация	мутация	мутация	мутация	мутация
<i>PTEN</i>	мутация	делеция	WT	мутация	мутация	мутация	мутация
<i>CDKN2A</i>	делеция	делеция	делеция	делеция	делеция	делеция	делеция

Примечание. А – астроцитарная, Г – глиальная, П – полигональная, ПМ – плеоморфизм, СМ – смешанная, Ф – фибробластоподобная, Э – эпителиоидная; М – мужской, Ж – женский; WT – «дикий тип», «+» присутствует, «-» – отсутствует.

Таблица составлена на основе публикаций: Akiyama Y. et al., 2014; Bandres E. et al., 2005; Bigner D.D. et al., 1981; Birosco A. et al., 1999; Giard D.J. et al., 1973; Melendez B. et al., 2011; Ponten J. et al., 1968; Roos W.P. et al., 2007; Stein G.H., 1979.

Известно, что чувствительность клеток глиобластом к действию химиотерапевтических препаратов и облучения зависит от молекулярно-генетических особенностей клеток. В клеточных линиях глиобластом описаны нарушения сигнальных путей: RB1, p53, PI3K. Во многих клеточных линиях отмечается гомозиготная мутация гена CDKN2A, приводящая к отсутствию онкосупрессора p16, отвечающего за p16INK4/CDK4/RB1 путь и регуляцию клеточного цикла.

В глиобластомах часто встречаются мутации гена онкосупрессора p53, который участвует в регуляции клеточного цикла и развитии апоптоза (Таблица 1). Наличие белка «дикого типа» в клетках, подвергающихся действию генотоксических факторов, приводит к остановке клеточного цикла, во время которой проходят процессы репарации ДНК, а в случае

отсутствия репарации – к развитию апоптоза. При наличии мутации p53 не происходит корректной репарации повреждений и это способствует накоплению мутаций в клетках.

При лечении глиобластом с мутацией p53 и экспрессии MGMT применение препаратов хлорэтилнитрозомочевины (кармустина или нимустина) более эффективно, чем темозоломида [Roos W.P. et al., 2007]. Клетки глиобластом, экспрессирующие MGMT, более устойчивы к действию нитрозомочевины, чем клетки, характеризующиеся отсутствием этого фермента. Например, клеточная линия A172 с «диким типом» p53 и отсутствием MGMT, более чувствительна к действию кармустина по сравнению с линиями T98G и U373, для которых характерны мутация p53 и экспрессия MGMT [Birocco A. et al., 1999; Bandres E. et al., 2005].

Для изучения такой высоко гетерогенной опухоли, как глиобластома, важно использовать одновременно несколько клеточных линий, различающихся между собой. Клеточные линии A172 и T98G, обладая некоторыми общими свойствами, отличаются между собой по ряду клеточных и молекулярных характеристик. Известно, что клетки A172 экспрессируют p53 «дикого типа», тогда как для клеток T98G характерна мутация гена и наличие мутантного белка, в то же время экспрессия гена MGMT отмечается в T98G и отсутствует в A172 [Akiyama Y. et al., 2014]. Один из основных онкосупрессоров PTEN, ингибирующий RTK/PI3K/Akt путь, экспрессируется в клетках T98G и отсутствует в A172 вследствие гомозиготной делеции гена. Для клеточных линий A172 и T98G характерно отсутствие GFAP. Низкая экспрессия гена *GFAP* в клетках обеих линий связана с эпигенетическими изменениями и может быть увеличена воздействием 5-аза-2'-дезоксцитидина (децитабина), наиболее сильно этот эффект проявлялся в клетках T98G [Restrepo A. et al., 2011]. Экспрессия гена *CD133* отмечена в клетках обеих линий [Akiyama Y. et al., 2014].

Заключение

Глиобластомы – злокачественные опухоли головного мозга, которые до настоящего времени не излечимы. Серьезную проблему для терапии этих опухолей представляет высокая гетерогенность глиобластом. Инвазия и высокая скорость распространения клеток вносят значительный вклад в прогрессию заболевания. Устойчивость к действию терапии могут проявлять различные популяции клеток глиобластом. Эти популяции могут быть представлены стволовыми опухолевыми клетками. Однако, панель маркеров, идентифицирующих данные популяции клеток, до сих пор не определена. Действие облучения и химиопрепаратов приводят к повышению клеточной гетерогенности. В ответ на противоопухолевое лечение популяции опухолевых клеток могут входить в состояние длительной остановки пролиферации (состояние «покоя»), которое может быть реализовано через полиплоидию, многоядерность или слияние

клеток. Хотя подобные клетки могут быть рассмотрены как погибающие, они остаются жизнеспособными длительное время. Такие полиплоидные и многоядерные клетки могут не пролиферировать, но продуцировать различные факторы и оказывать влияние на окружающие клетки. Современные исследования показывают, что химиопрепараты и ионизирующее излучение, используемые в стандартных протоколах лечения, приводят к изменениям популяционного состава опухоли, а также изменениям экспрессии в клетках ряда генов, связанных с клеточным циклом и репарацией. Исследование влияния облучения и химиопрепаратов на экспрессию генов факторов, связанных с прогрессией опухолей, в опухолевых клетках является важным моментом. Одной из ключевых причин в прогрессии глиобластом является продукция клетками самой опухоли ростовых факторов (TGF β 1, HGF, EGF и других), являющихся активаторами важных сигнальных путей, связанных с выживаемостью, а также индукторами ЭМП, приводящего к повышению инвазивности опухолевых клеток. Среди препаратов, рекомендуемых для лечения глиобластом, применяют темозоломид и соединения нитрозомочевины, в том числе фотемустин. Сведения о действии фотемустина на клеточные линии глиобластом слабо отражены в литературных источниках. Для моделирования такой гетерогенной опухоли, как глиобластома, целесообразно использовать несколько различающихся между собой клеточных линий, культивирование которых проходит в стандартных контролируемых условиях (без учета влияния сигналов всего организма) и позволяет получить необходимое количество клеточного материала.

Определение маркеров, ассоциированных с резистентностью глиобластом, оценка изменений популяционного состава и экспрессии в клетках генов ряда факторов, ассоциированных с прогрессией опухолей, после действия фотемустина или облучения, представляется актуальным исследованием, результаты которого могут помочь оценить прогноз течения заболевания и эффективность действия стандартной терапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клеточные линии

Клеточные линии глиобластом A172 и T98G были получены из коллекции клеточных культур НИИ гриппа МЗ РФ, линии T2 и R1 – из лаборатории клеточной биологии Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова (Лен. обл., Гатчина). Линия R1 была выделена из опухоли пациента в возрасте 45 лет с диагнозом глиобластома левой лобной доли, линия T2 – из опухолевого материала пациента в возрасте 61 года с диагнозом мультиформная глиобластома правых теменной и затылочной долей. К началу исследований линия R1 прошла 23 пассажа, линия T2 – 29 пассажей культивирования.

Клеточные линии культивировали в флаконах площадью 25 см² в ростовой среде, содержащей α -MEM, глютамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и гентамицин (или 0,1 мг/мл стрептомицина и 100 ЕД/мл пенициллина G). Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO₂. Для пересева клеток из флакона удаляли ростовую среду, флакон промывали 5 мл фосфатно-солевого раствора, вносили раствор смеси трипсина и версена. Время снятия клеток контролировали под микроскопом. Активность трипсина ингибировали в среде α -MEM с 10% ЭТС. Затем клетки центрифугировали 3 мин, после чего ресуспендировали в ростовой среде. Во флакон вносили по 4,5 мл клеточной суспензии, содержащей 150–400 тыс клеток.

Ростовые характеристики клеточных культур определяли, подсчитывая количество клеток, снятых с поверхности флаконов с помощью кондуктометрического счетчика Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, США). Время удвоения численности популяций определяли по формуле

$$td = \ln 2 * N_0 / (dN / dt) \quad (1)$$

где td – время удвоения численности популяций;

N₀ – исходное число клеток (посевная доза);

dN – прирост числа клеток;

dt – время культивирования клеток, ч [Пиневич А. А. и др., 2014].

2.2. Морфологические исследования

Живые клетки фотографировали, используя инвертированный микроскоп со встроенной камерой Prima Vert (Carl Zeiss, Германия). Оценку жизнеспособности клеток проводили после окраски 0,4%-ным раствором трипанового синего в фосфатно-солевом растворе. Для морфологического анализа клетки культивировали во флаконах до 70%-ного конфлюэнта, фиксировали 5 мин смесью ледяного (-20 °C) 96%-ного этанола и фосфатно-солевого раствора в соотношении 1:1, затем ледяным этанолом 7 мин. Окрашивали по Май-Грюнвальду Гимзе:

красителем Май-Грюнвальд 5 мин, красителем Гимза 15 мин. После фиксации клетки отмывали фосфатно-солевым раствором в течение 5 мин, между этапами окрашивания – 3 раза по 1 мин дистиллированной водой. Окрашенные клетки фотографировали, используя инвертированный микроскоп с цифровой камерой (Nikon, Япония).

2.3. Иммуноцитохимические исследования

Клетки культивировали в камерах на стеклах, фиксировали забуференным 3,8%-ным раствором формальдегида 10 мин. Демаскировку антигенов проводили путем термической инкубации при 95–99 °С в 10 ммоль/л цитратном буфере (pH 6,0) в течение 20 мин. Присутствие маркерных белков определяли, используя антитела в соответствующих разведениях к GFAP (1:200), S100 (1:2000), виментину (1:200), β -тубулину III (1:2000), p53 (1:100), MGMT (1:200) и Ki-67 (1:200). Клетки инкубировали с первичными антителами в течение 30 мин во влажной камере при комнатной температуре. Инкубацию с вторичными антителами проводили в течение 30 мин, обработку раствором диаминобензидина – 5 мин. Для визуализации использовали набор реагентов Dako REAL EnVision Detection System-HRP/DAB+. Между этапами фиксации, термической инкубации, воздействия первичных антител, вторичных антител и раствора диаминобензидина проводили по две процедуры отмывания трис солевым буферным раствором (pH 7,6) по 5 мин. Контроль специфичности реакции проводился без использования первичных антител. Ядра докрасивали гематоксилином 2 мин.

Изображения получали при помощи сканера Leica SCN 400 (Leica Microsystems, Германия) с использованием программы Aperio Image Scope (Leica Microsystems, Германия), а также микроскопа Axio Imager A2 с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия).

2.4. Воздействие фотемустина на клетки глиобластом

Фотемустин (препарат «Мюстофоран») растворяли в 96%-ном этаноле, замораживали и хранили при температуре -80 °С. Раствор размораживали непосредственно перед внесением в клеточную культуру и разводили до необходимой концентрации в среде α -МЕМ. Для оценки выживаемости клетки культивировали в 96-луночных планшетах в посевной дозе 8 тыс клеток на лунку. Клетки в логарифмической фазе роста обрабатывали в течение 1 ч раствором ФМ в бессывороточной среде в разных концентрациях, трижды отмывали бессывороточной средой и культивировали далее в ростовой среде обычного состава. Замену половины ростовой среды на свежую проводили на 4-е сут культивирования. Контролем служили клетки, которые в течение 1 ч инкубировали в бессывороточной среде. Для обработки клеток использовали ФМ в концентрациях 0,5–750 мкг/мл. На 7-е сут культивирования проводили подсчет клеток, снятых

с поверхности планшетов, с помощью кондуктометрического счетчика Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, США).

При постановке остальных экспериментов клетки всех линий культивировали во флаконах до 70%-ного конфлюэнтного монослоя и затем обрабатывали в течение 1 ч раствором ФМ в бессывороточной среде. Дозы препарата рассчитывали в зависимости от ЛД₅₀, установленной по выживаемости клеточных культур. После удаления препарата каждые 2–3 сут проводили замену 2/3 ростовой среды, и по достижении клетками 70–80%-ного монослоя их пересеивали, а затем подвергали повторному воздействию ФМ.

2.5. Определение жизнеспособности клеток методом МТТ

Оценку жизнеспособности клеток проводили методом МТТ, основанным на способности живых клеток метаболизировать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) желтого цвета в формазан пурпурного цвета. В ростовую среду клеток, культивируемых в 96-луночном планшете, вносили по 20 мкл раствора МТТ в фосфатно-солевом буфере в концентрации 5 мг/мл. После инкубации в течение 2,5 ч супернатант удаляли и добавляли 150 мкл ДМСО до растворения кристаллов формазана. Определение оптической плотности проводили на спектрофотометре Multiskan EX (Thermo Labsistem, Финляндия) при 540 нм, а также 630 нм в качестве референсной длины волны. Результаты были выражены в процентном отношении от контроля. Способность преобразовывать МТТ в контроле была принята как 100%-ная выживаемость. Все эксперименты были проведены трижды с постановкой дублей в каждом эксперименте.

2.6. Облучение клеточных линий глиобластом

Клеточные культуры подвергали действию фотонного излучения на линейном ускорителе Elekta Precise Treatment System ТМ (Elekta, Швеция) с энергией излучения 6 МэV. Мощность дозы составляла 460 сГр/мин. Поскольку максимум ионизации на линейном ускорителе с энергией 6 МэV находится на расстоянии около 9 мм, при моделировании использовали парафиновый бокс. При проведении облучения флаконы помещали в углубление парафинового бокса с толщиной стенок 12 мм (Рисунок 1). Сверху бокс закрывали крышкой из парафина.



Рисунок 1 — Схема расположения флакона в парафиновом боксе

Для построения трехмерной модели (Рисунок 2) выполняли КТ-томографию на компьютерном томографе Toshiba Aquilion LB (Toshiba Medical Systems, Япония) в режиме генерации 32 среза в секунду с использованием многоядного детектора (SSMD) с толщиной среза 1 мм и шагом 1 мм.

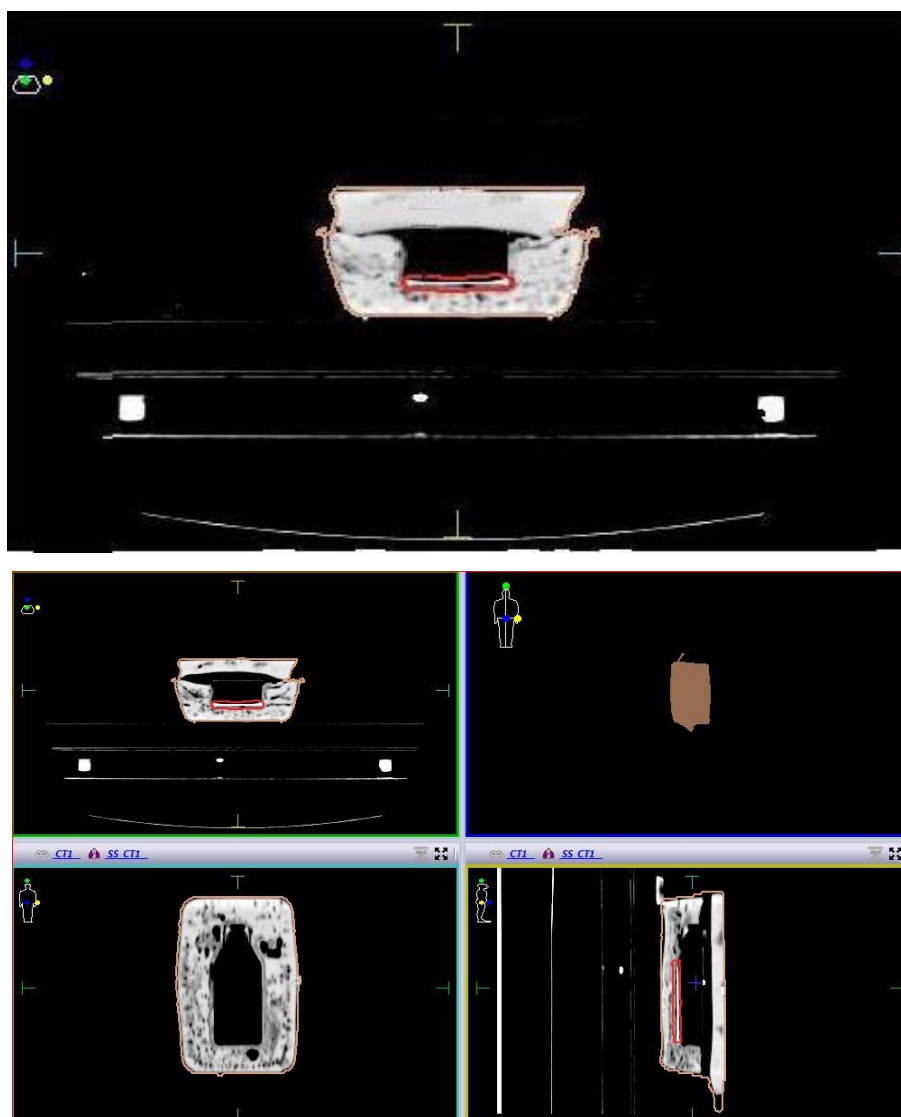


Рисунок 2 — Трехмерная модель облучения флаконов. Красным цветом выделена зона с клеточной культурой, куда рассчитана доза облучения.

Парафиновый бокс располагали по отношению к источнику излучения таким образом, чтобы на пути фотонов не было границы воздуха и жидкости, которая могла бы приводить к значительным дозиметрическим погрешностям (Рисунок 3).

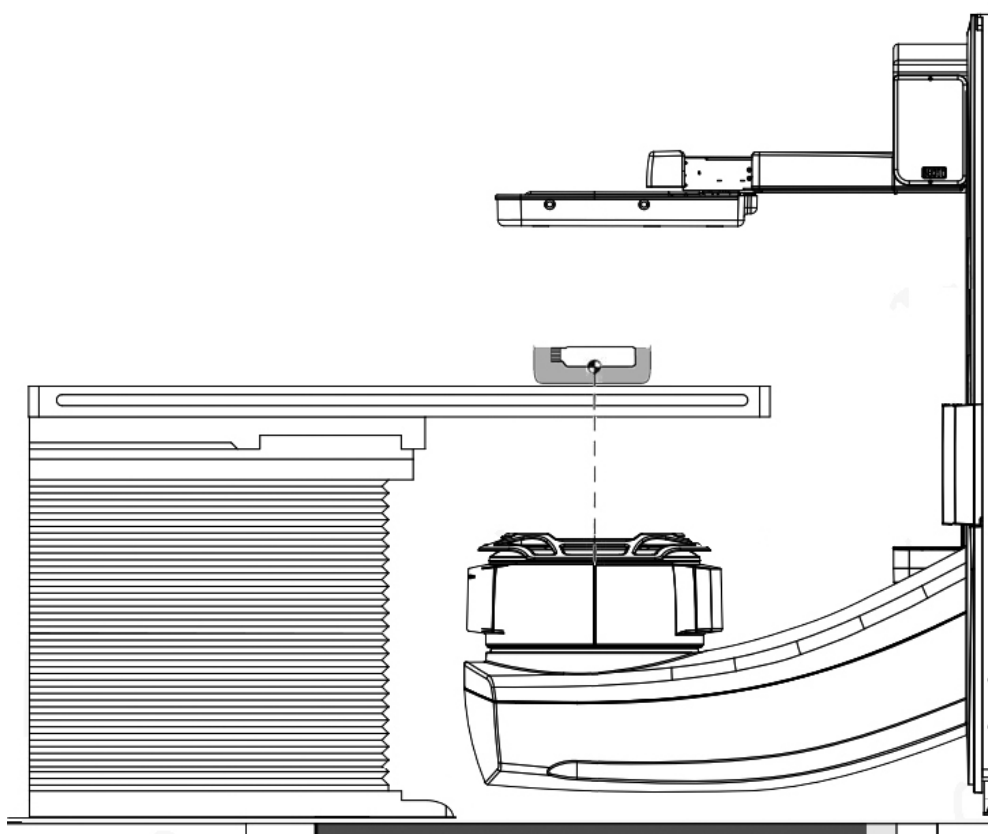


Рисунок 3 — Схема размещения бокса с флаконом клеточных культур на линейном ускорителе Elekta Precise

Для проверки расчетных данных, полученных с помощью системы планирования XiOv4.6 (Рисунок 4), была проведена пленочная дозиметрия. При дозиметрии были использованы радиохромные пленки Gafchromic® Ebt. Пленку помещали на дно флакона для культивирования клеток. Над пленкой находилось 4,5 мл жидкой фазы. Для чтения показаний использовали сканер EPSON Expression 11000XL. Калибровочные данные были получены с использованием двумерной детекторной матрицы MatriXX (IBA). Обработку и анализ данных

выполняли, используя программное обеспечение MatLabR2010a и OmniPro I'mRT v1.7 (IBA) [Кузнецова Е.В. и др. 2012].

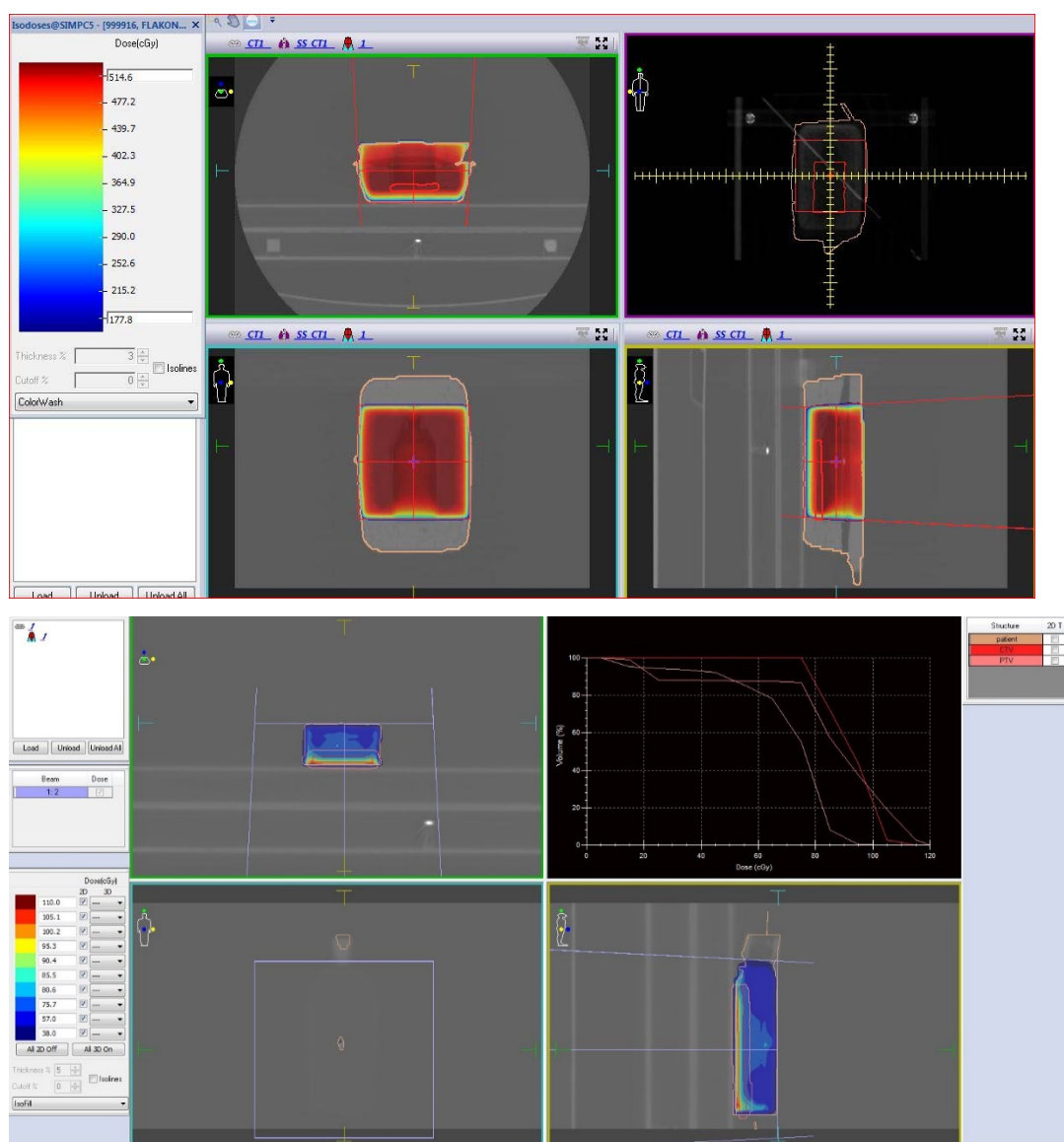


Рисунок 4 — Изодозные карты распределения облучения на флакон для культивирования клеток

Клетки перед облучением культивировали до 70%-ного конфлюэнтного монослоя в неветилируемых флаконах площадью 25 см². При выборе дозы однократного облучения руководствовались опубликованными данными [Mahabir R. et al., 2014]. При определении режимов и суммарной дозы фракционированного облучения клеток ориентировались на схемы радиотерапии пациентов. Клетки подвергали однократному, повторному и фракционированному облучению. Однократно клетки облучали в дозе 10 Гр. Фракционированное облучение проводили по 2 Гр/сут в течение 5 дней, затем после

двухдневного перерыва продолжали облучение в том же режиме до достижения суммарной дозы 36 или 50 Гр, или по 5 Гр/сут до достижения суммарной дозы 60 Гр. Для оценки действия повторного облучения клетки глиобластом A172 и T98G после однократного облучения в дозе 10 Гр культивировали до 70%-ного конфлюэнтного монослоя, переседали и по достижении 70%-ного конфлюэнта вновь облучали в дозе 20 Гр. В клеточных культурах замену ростовой среды проводили через 1 ч после окончания сеанса облучения, каждые 2–3 сут заменяли 2/3 среды.

2.7. Проточная цитометрия

2.7.1. Проточная иммуноцитофлуориметрия

Клетки культивировали до 70%-ного конфлюэнтного монослоя, снимали с поверхности флаконов и дважды отмывали буфером BD FBS. Затем клетки инкубировали с антителами в течение 30 мин при 4 °С. Для определения поверхностного фенотипа использовали антитела к маркерам CD31, CD90, CD106, CD147, конъюгированные с изотиоцианатом флуоресцеина (FITC), CD29, CD34, CD44, CD56, CD73, CD105, CD146, CD151, CD166 – фикоэритрином (PE), и CD133/2, меченые аллофикоцианином (APC), а также соответствующие изотипические контроли. Для определения доли жизнеспособных клеток использовали BD Via-Probe Cell Viability Solution, содержащий краситель нуклеиновых кислот 7-амино-актиномицин D (7-AAD). Для фиксации окрашенных клеток использовали раствор BD CellFix. Исследования проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Данные анализировали с помощью программы BD Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США).

Исследование поверхностных маркеров проводили на клетках линии A172 после действия ФМ в концентрации 50 мкг/мл, клетках линий T98G, T2 и R1 – 100 мкг/мл ФМ, после 2 пассажей культивирования. Клетки, облученные в дозе 10 Гр, также исследовали после 2 пассажей культивирования.

2.7.2. ДНК цитометрия

Для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки снимали с поверхности флаконов и трижды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором. Выделение и окраску ядер проводили с использованием набора реагентов Cycle Test Plus DNA согласно рекомендациям производителя. Для выделения ядер использовали 0,25%-ный раствор трипсина, которым обрабатывали клетки в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли раствор с ингибитором трипсина и РНКазы А на 10 мин. Окрашивали охлажденным раствором пропидия йодида (+4 °С) в конечной концентрации 125 мкг/мл 15 мин.

Для сбора данных использовали программу CellQuest Pro (Becton Dickinson, США), результаты анализировали с помощью специализированного программного обеспечения ModFit (Verity Software House, США). Для удаления из анализа агрегатов использовали метод определения дуплетов FL2A/FL2W, а также частицы для контроля качества.

2.8. Исследование активности генов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Исследование активности генов проводили в интактных клетках и в популяциях клеток, подвергнутых действию ФМ и облучения в разных режимах. Клетки после воздействия ФМ, сохраняющие пролиферативную активность, исследовали после пересева и восстановления клетками 70%-ного конфлюэнтного монослоя. Из непролиферирующих клеток мРНК выделяли через 21–30 сут после воздействия ФМ. Облученные клетки, сохраняющие пролиферативную активность, исследовали после пересева и восстановления клетками 70%-ного конфлюэнтного монослоя. Из непролиферирующих клеток мРНК выделяли через 30–40 сут после последнего сеанса облучения.

РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent согласно рекомендациям производителя. В реакции обратной транскрипции использовали 500 нг РНК. Реакционная смесь включала 40 ед. М-MuLV обратной транскриптазы, 1 мМ смеси dNTP, 0,2 мкг random-праймера, 20 ед. ингибитора РНКаз RiboLock RNase Inhibitor и деионизированную воду. Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя обратной транскриптазы. ПЦР в реальном времени проводили на термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США) в объеме 25 мкл в 96-луночных ПЦР планшетах. Реакционная смесь состояла из 0,5 мкл кДНК, полученной в реакции обратной транскрипции, буфера для Hot-start Taq-ДНК-полимеразы, 0,8 мМ смеси dNTP, 4 мМ MgCl₂, 1 ед. Hot-start Taq-ДНК-полимеразы, 1 мкл Sybr Green и деионизированной воды. В реакции использовали заранее подобранные оптимальные концентрации праймеров в диапазоне 200–300 нМ. Последовательности праймеров (Таблица 2) были заимствованы из Банка праймеров Harvard Medical School (США) и синтезированы фирмой «АлкорБио» (Россия). После денатурации при 95 °С в течение 10 мин проводили 40 циклов амплификации в следующем режиме: плавление 95 °С, 30 с – отжиг 56 °С, 30 с – синтез 72 °С, 30 с.

Уровень экспрессии генов представляли в виде разницы (ΔCT) между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*). СТ – пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции.

Для сравнения уровней экспрессии генов в клетках до и после действия ФМ или облучения использовали метод относительного количественного определения экспрессии гена

(метод $2^{-\Delta\Delta CT}$). Величина $2^{-\Delta\Delta CT}$ представляет собой кратность разницы между экспрессией гена в клетках после воздействия ФМ или облучения и в интактных клетках [Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001].

Таблица 2 — Последовательности праймеров, использованных для амплификации генов

Ген	Праймеры	Длина п.н.	NCBI номер
<i>VEGF</i>	Прямой 5'–AGGGCAGAATCATCACGAAGT–3', Обратный 5'–AGGGTCTCGATTGGATGGCA–3'	75	NM_001025366.3
<i>FGF2(b)</i>	Прямой 5'–AGAAGAGCGACCCTCACATCA–3', Обратный 5'–CGGTTAGCACACACTCCTTTG–3'	82	NM_002006.6
<i>HGF</i>	Прямой 5'–GCTATCGGGGTAAAGACTTACA–3', Обратный 5'–CGTAGCGTACCTCTGGATTGC–3'	99	NM_001010931.3
<i>TGFβ1</i>	Прямой 5'–GGCCAGATCCTGTCCAAGC–3', Обратный 5'–GTGGGTTTCCAACCATTAGCAC–3'	202	NM_000660.7
<i>EGF</i>	Прямой 5'–TGTCCACGCAATGTGTCTGAA–3', Обратный 5'–CATTATCGGGTGAGGAACAACC–3'	133	NM_001178130.3
<i>αSMA</i>	Прямой 5'–GACGAAGCACAGAGCAAAAGAG–3', Обратный 5'–TGGTGATGATGCCATGTTCTATCG–3'	67	NM_001613.4
<i>FAP</i>	Прямой 5'–CAAAGGCTGGAGCTAAGAATCC–3', Обратный 5'–ACTGCAAACATACTCGTTCATCA–3'	165	NM_001291807.3
<i>TNC</i>	Прямой 5'–TCCCAGTGTTTCGGTGGATCT–3', Обратный 5'–TTGATGCGATGTGTGAAGACA–3'	131	NM_002160.4
<i>THBS1</i>	Прямой 5'–AGACTCCGCATCGCAAAGG–3', Обратный 5'–TCACCACGTTGTTGTCAAGGG–3'	157	NM_003246.4
<i>GAPDH</i>	Прямой 5'–GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC–3', Обратный 5'–CATGAGTCCTTCCACGATACC–3'	123	NM_001357943.2

2.9. Статистическая обработка

Эксперименты проводили в 3–6 повторностях. Для статистической обработки данных использовали программы Microsoft Excel и STATISTICA 6.0. Построение графиков и гистограмм осуществляли при помощи программы Microsoft Excel. Результаты проточной цитометрии представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий выборок с целью попарного сравнения показателей в исследуемых

группах до и после воздействия фотемустина или облучения (величина $2^{-\Delta\Delta CT}$), применяли критерий Манна-Уитни. Для анализа использовались выборки небольшого объема, не подчиняющихся нормальному распределению. Вычисляли среднее арифметическое (m), медиану (Me), среднее квадратичное отклонение (σ). Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $P \leq 0,05$. Полученные различия свидетельствуют только о тенденциях и направлении изменений.

2.10. Использованные реактивы и расходные материалы

В работе были использованы следующие реагенты и расходные материалы: гентамицин, пенициллин-стрептомицин, раствор трипсина и версена, среда α -MEM с глутамином, трипановый синий, фосфатно-солевой раствор без Ca^{2+} и Mg^{2+} (БиолоТ, Россия), моноклональные кроличьи антитела к β -тубулину класса III (клон EP1569Y, Epitomics, США), набор красителей Май-Грюнвальд Гимза (Bio-Optica, Италия), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), моноклональные кроличьи антитела к Ki-67 (клон SP6, Thermo Scientific, США), поликлональные кроличьи антитела к MGMT (Abcam, Англия), моноклональные мышинные антитела к p53 (клон DO-7, Leica, Германия), моноклональные мышинные антитела к виментину (клон V9), моноклональные мышинные антитела к GFAP (клон 6F2), поликлональные кроличьи антитела к коровьему S100, Antibody diluent, Dako REAL EnVision Detection System-HRP/DAB+ kit; трис солевой буферный раствор EnVision FLEX Wash Buffer (Dako, Дания), гематоксилин (Histoline, Россия), моноклональные антитела к CD133/2 APC (Miltenyi Biotec, Германия), меченные флуорохромами моноклональные антитела к CD29, CD31, CD34, CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD147, CD151, CD166, и соответствующие изотипические контроли, BD FBS, BD CellFix, Cell Cycle Test Plus DNA Reagent Kit, BD Via-Probe Cell Viability Solution, частицы для контроля качества, вентилируемые флаконы для культивирования 25 см², камеры для культивирования клеток на стеклах BD Falcon (Becton Dickinson, США), TRIzol Reagent (Life Technologies, США), M-MuLV обратной транскриптазы, смесь dNTP, random-праймер, Hot-start Taq-ДНК-полимераза, буфер для Hot-start Taq-ДНК-полимеразы, раствор MgCl₂ (Сибэнзим, Россия), RiboLock RNase Inhibitor, Sybr Green (BioDye, Россия), «Мюстофоран» (Cenexi-Laboratoires Thissen S.A., Бельгия), невентилируемые флаконы для культивирования 25 см² (NUNC, Дания), камеры для культивирования клеток на стеклах (Advanced Biotech, США), 3,8%-ный раствор формальдегида (Serosep, Ирландия), диметилсульфоксид, MTT (Sigma-Aldrich, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Морфологическая и иммуноцитохимическая характеристика клеток линий глиобластом

Исследуемые клеточные линии отличались между собой по морфологическому составу. В клеточных линиях A172 и R1 преобладали отростчатые клетки, линию T98G составляли клетки отростчатой и полигональной формы, в то время как для линии T2 были характерны отростчатые и веретеновидные клетки. Во всех клеточных линиях отмечали присутствие многоядерных клеток. Наиболее часто такие клетки встречались в линии T2, наиболее редко – в R1 (Рисунок 5).

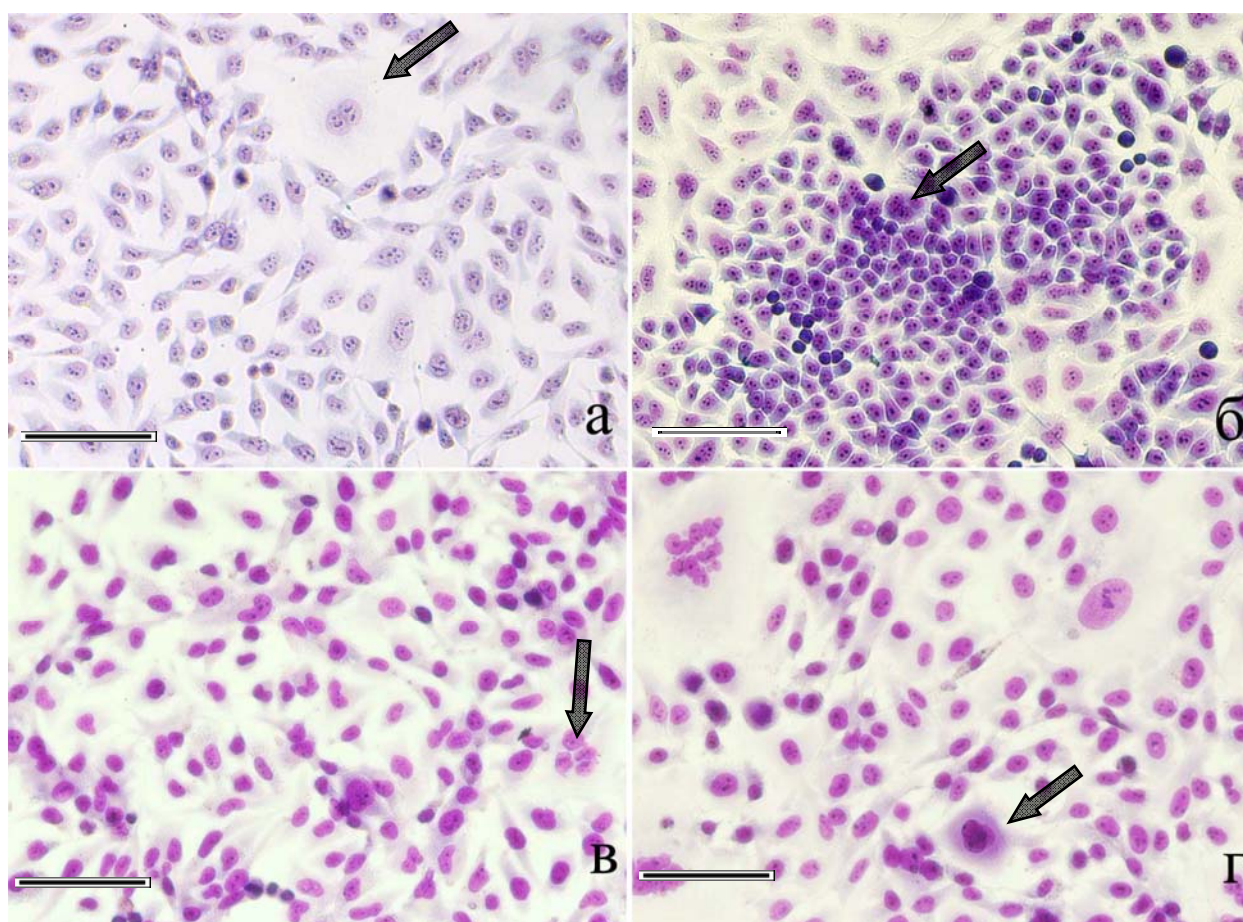


Рисунок 5 — Клеточные линии глиобластом: A172 (а), T98G (б), R1 (в) и T2 (г). Окраска по Май-Грюнвальду Гимзе. Стрелки указывают на многоядерные клетки Масштабные отрезки: 100 мкм.

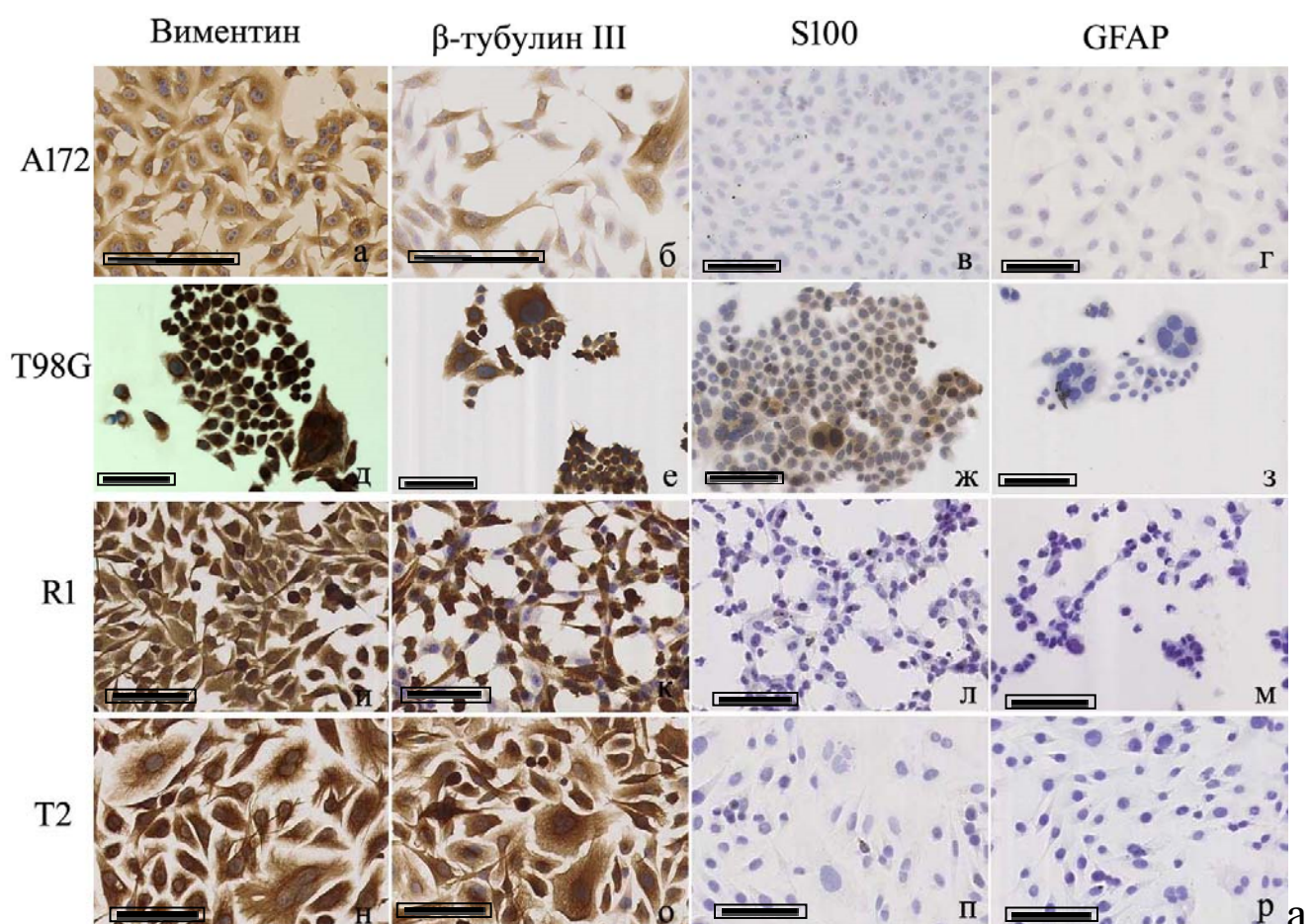
Иммуноцитохимическое исследование показало, что клетки всех линий не экспрессировали маркер нейроглии GFAP и содержали белок промежуточных филаментов виментин (Таблица 3, Рисунок 6). Присутствие белка S100 отмечено в T98G, тогда как в

клетках остальных линий этот белок обнаружен не был. Нейральный маркер β -тубулин III был выявлен в T98G, T2 и A172, а также в большей части (около 80%) популяций R1. Белок p53 также был обнаружен в клетках линий T98G, T2 и A172, однако этот белок был выявлен только в небольшой части (около 20%) клеток линии R1. Фермент MGMT не был обнаружен только в линии A172. Во всех клеточных линиях был отмечен высокий уровень Ki-67 – маркера пролиферативной активности.

Таблица 3 — Присутствие внутриклеточных маркеров в линиях глиобластом

Линии	GFAP	Виментин	β -тубулин III	S100	MGMT	p53	Ki-67
A172	-	+	+	-	-	+	+
T98G	-	+	+	+	+*	+	+
R1	-	+	+*	-	+*	+*	+
T2	-	+	+	-	+*	+	+

Примечание. «+» – маркер выявлен, «-» – маркер не выявлен, «+*» – отмечена гетерогенность экспрессии маркера в популяциях клеток.



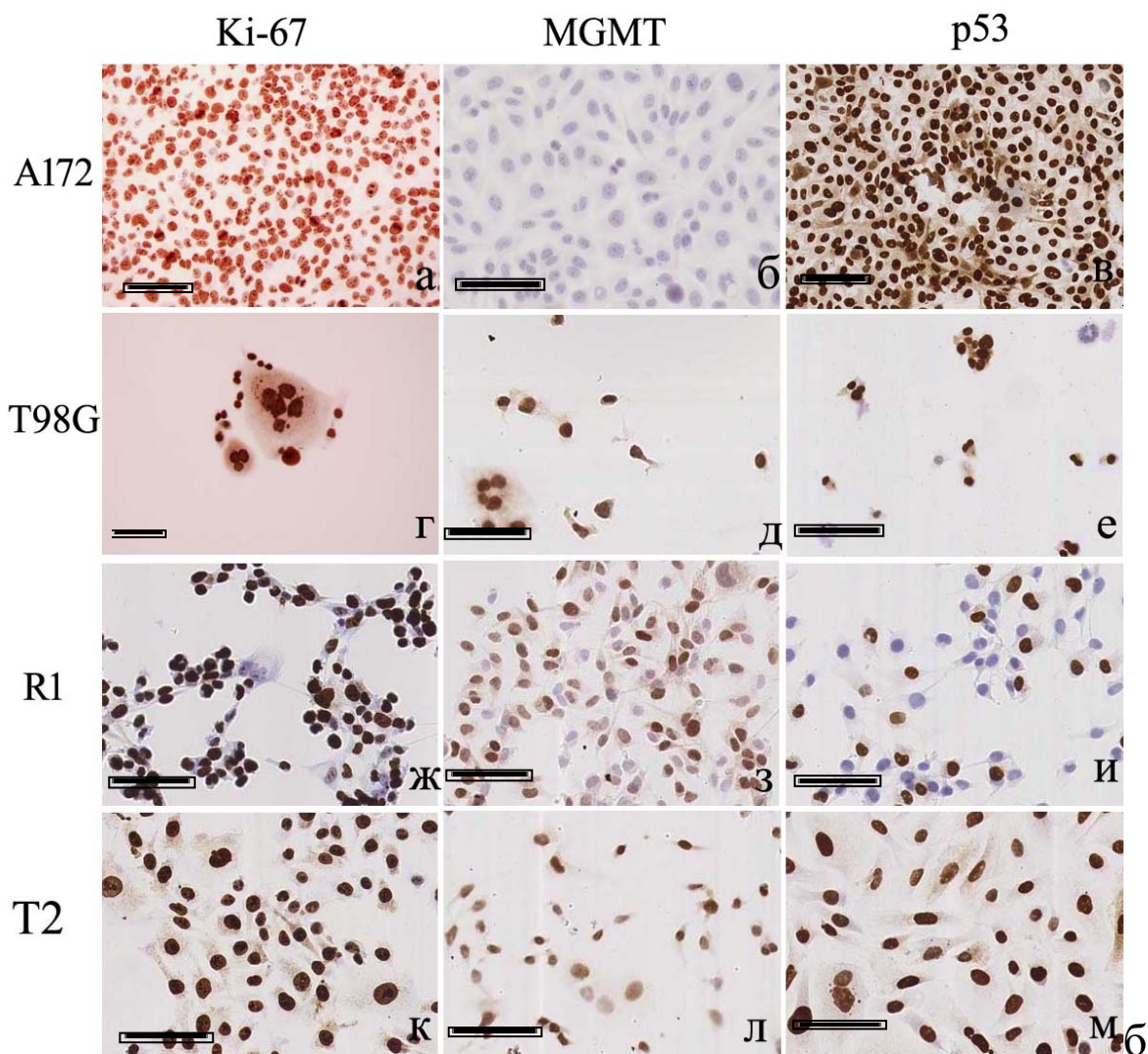


Рисунок 6 — Иммуноцитохимическое исследование клеток линий глиобластом: а) A172 (а, б, в, г), T98G (д, е, ж, з), R1 (и, к, л, м). T2 (н, о, п, р) на антигены виментин (а, д, и, н), β -тубулин III (б, е, к, о), S100 (в, ж, л, п), GFAP (г, з, м, р); б) A172 (а, б, в) T98G (г, д, е), R1 (ж, з, и). T2 (к, л, м) на антигены Ki-67 (а, г, ж, к), MGMT (б, д, з, л), p53 (в, е, и, м). Масштабные отрезки: 100 мкм.

Таким образом, все клеточные линии глиобластом отличались между собой по экспрессии исследуемых внутриклеточных белков. Линия R1, по сравнению с другими клеточными линиями представляла собой более гетерогенные популяции, отличающиеся по экспрессии β -тубулина III, белка p53 и MGMT.

3.2. Характеристика роста клеточных линий глиобластом

Клетки линий A172 и T98G обладали высокой пролиферативной активностью. При посевной дозе 8 тыс клеток на 1 см² время удвоения в логарифмической фазе роста линии A172 составляло 33–48 ч, для T98G этот показатель варьировал в пределах 26–36 ч. Клетки новых

клеточных линий глиобластом также характеризовались высокой скоростью роста, для линии R1 в логарифмической фазе роста время удвоения составляло 36–40 ч, в культуре T2 этот показатель варьировал в пределах 32–36 ч. График роста клеточных линий представлен на Рисунке 7.

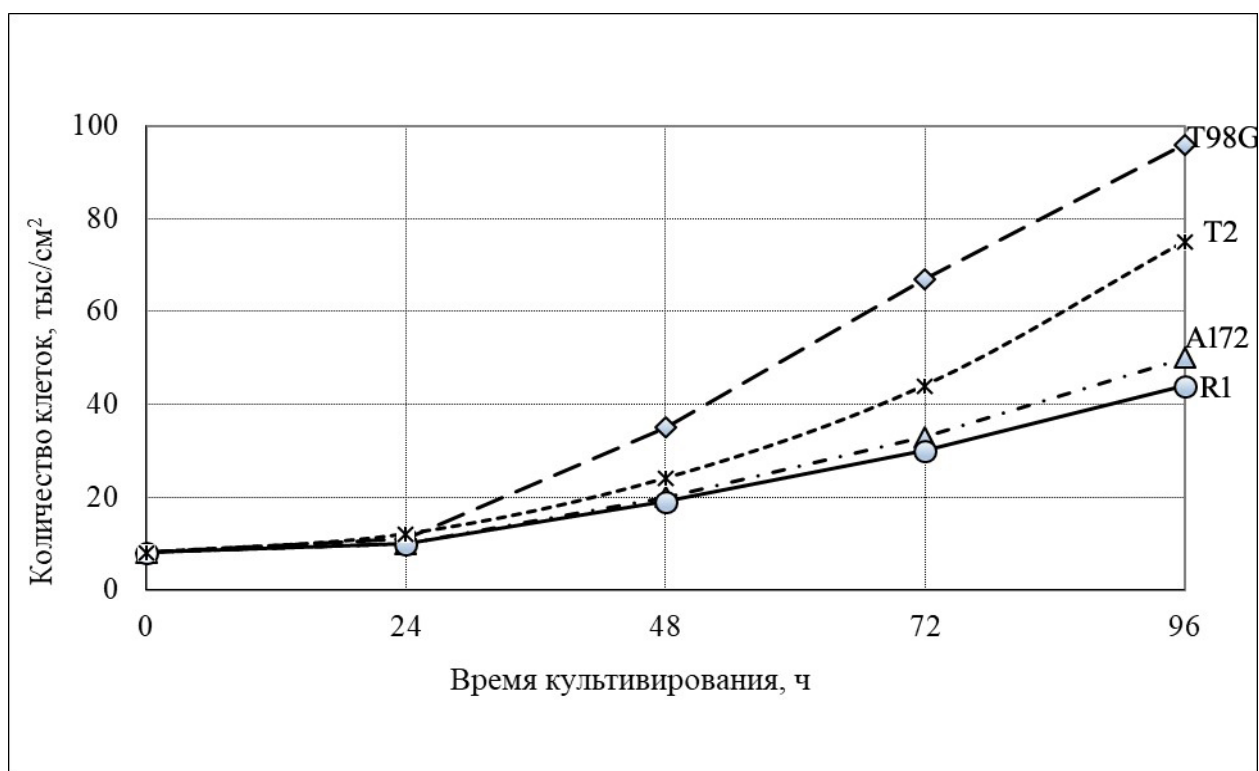


Рисунок 7 — График роста клеточных линий глиобластом при посевной дозе 8 тыс кл/см². Сплошная линия – R1, крупный пунктир – T98G, мелкий пунктир – T2, точка тире – A172.

3.3. Характеристика клеток глиобластом по экспрессии поверхностных маркеров

При рассмотрении результатов анализа поверхностных антигенов маркеры, относящиеся к разным линиям дифференцировки (мезенхимные, нейрональные, эндотелиальные), были выделены отдельно (Таблица 4).

Более 95% клеток всех исследуемых линий экспрессировали на своей поверхности мезенхимные маркеры CD29, CD44, CD166. По экспрессии двух других мезенхимных маркеров – CD90 и CD105 линии глиобластом различались между собой (Рисунок 8). Оба этих маркера были представлены на большинстве клеток A172 и T2 и только на части клеток R1. Маркер CD90 был экспрессирован на $25,3 \pm 2,0\%$, CD105 на $28,8 \pm 2,2\%$ клеток линии R1. В линии T98G маркер CD90 был представлен только на $1,3 \pm 0,3\%$, а CD105 не обнаружен.

По экспрессии нейрональных маркеров были выявлены еще более выраженные различия между линиями. Линии T98G и T2 не содержали клеток, экспрессирующих CD56 и CD133/2, тогда как в составе глиобластомы A172 присутствовало $97,1 \pm 2,1\%$ CD56+ и $9,0 \pm 3,0\%$ CD133/2+ клеток, в составе R1 было отмечено $70,0 \pm 3,0\%$ CD56+ и $20,0 \pm 3,2\%$ CD133/2+ клеток.

Маркер CD151, как и CD147 были экспрессированы на более, чем 95% клеток всех исследуемых линий. Антиген CD146 присутствовал на более, чем 90% клеток A172, T98G, T2 и только на $74,9 \pm 2,3\%$ клеток R1. Эндотелиальный маркер CD106 был выявлен только на $10,2 \pm 0,6\%$ клеток R1 и отсутствовал на клетках всех остальных линий. Эндотелиальные маркеры CD31 и CD34 не были обнаружены ни на одной из линий глиобластом.

Таблица 4 — Экспрессия поверхностных маркеров в линиях глиобластом

Маркер	Доля позитивных клеток, %			
	A172	T98G	R1	T2
Мезенхимные маркеры				
CD29	$95,2 \pm 1,7$	$98,5 \pm 1,1$	$99,1 \pm 0,5$	$99,0 \pm 0,2$
CD44	$99,4 \pm 0,2$	$99,6 \pm 0,2$	$99,4 \pm 0,2$	$99,2 \pm 0,3$
CD73	$69,6 \pm 3,4$	$74,2 \pm 2,5$	$84,0 \pm 2,0$	$99,4 \pm 0,2$
CD90	$62,4 \pm 2,2$	$1,3 \pm 0,3$	$25,3 \pm 2,0$	$70,4 \pm 1,9$
CD105	$75,2 \pm 3,5$	$0,3 \pm 0,1$	$28,8 \pm 2,2$	$70,4 \pm 1,6$
CD166	$96,5 \pm 1,5$	$99,3 \pm 0,2$	$96,0 \pm 0,8$	$97,9 \pm 1,1$
Нейрональные маркеры				
CD56	$97,1 \pm 2,1$	$0,3 \pm 0,1$	$70,0 \pm 3,0$	$0,5 \pm 0,1$
CD133/2	$9,0 \pm 3,0$	$0,8 \pm 0,6$	$20,0 \pm 3,2$	$0,4 \pm 0,1$
Эндотелиальные маркеры				
CD31	$0,5 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$
CD34	$0,7 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$
CD106	$0,7 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	$10,2 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,1$
Другие маркеры				
CD146	$93,2 \pm 2,3$	$98,2 \pm 1,3$	$74,9 \pm 2,3$	$98,8 \pm 0,6$
CD147	$99,6 \pm 0,2$	$99,6 \pm 0,2$	$98,7 \pm 0,3$	$99,6 \pm 0,2$
CD151	$95,2 \pm 0,3$	$99,5 \pm 0,2$	$99,0 \pm 0,3$	$96,9 \pm 0,6$

Таким образом, клетки исследуемых линий экспрессировали мезенхимные маркеры, нейрональные маркеры были обнаружены на клетках A172 и R1, тогда как на клетках T98G и T2 эти маркеры не выявлены.

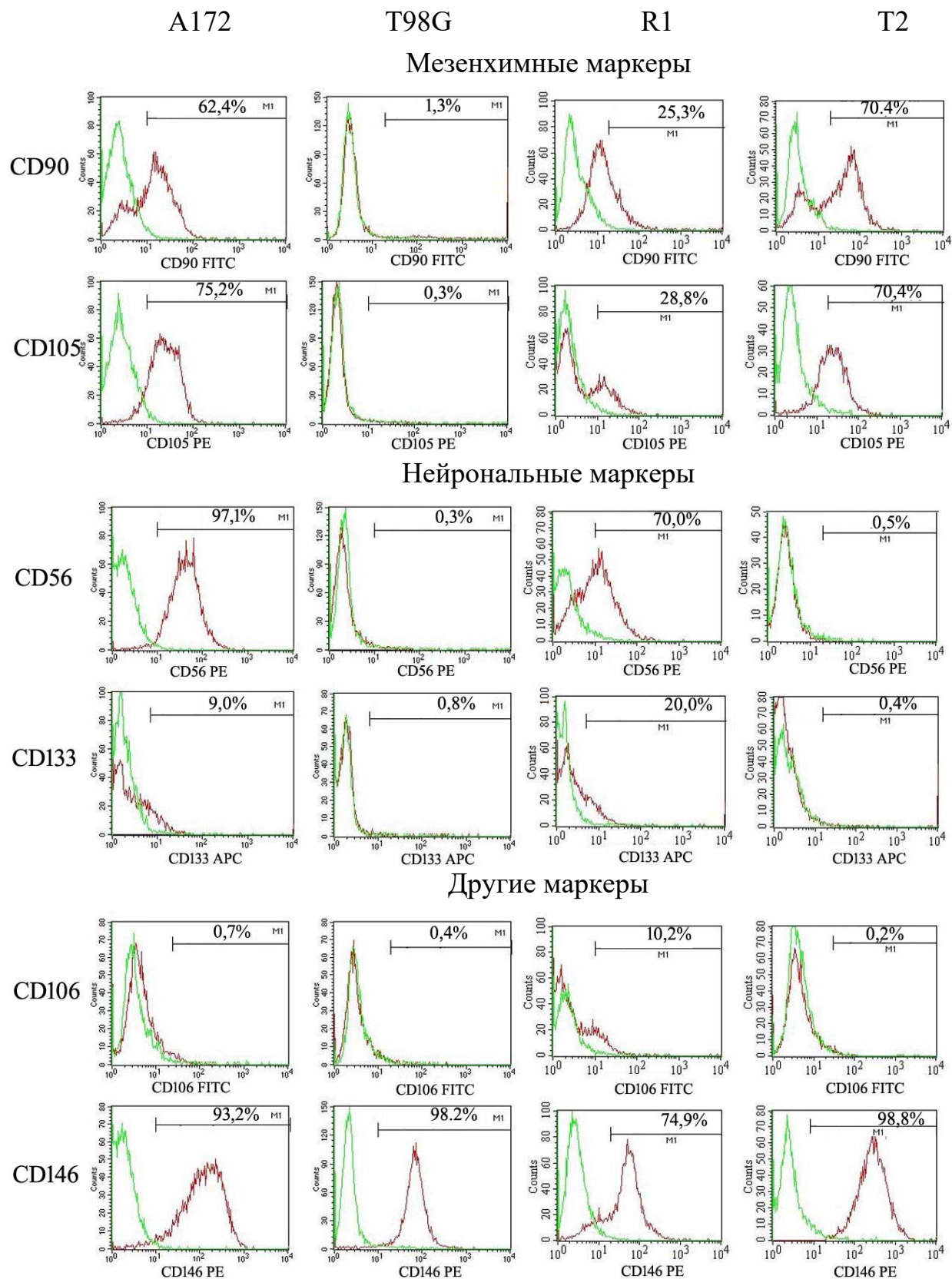


Рисунок 8 — Гистограммы распределения экспрессии поверхностных маркеров клеток A172, T98G, R1, T2, выявленные при иммуноцитофлуориметрическом анализе. Над каждой гистограммой указана доля клеток в % (среднее арифметическое), несущих соответствующий антиген, по сравнению с изотипическими контролями. По горизонтали — интенсивность флуоресценции (усл. ед.), по вертикали — число событий. Зеленая линия — изотипический контроль. Порог для отсечения позитивных клеток указан отрезком M1.

3.4. Исследование активности генов в клетках глиобластом

В клеточных линиях A172, R1, T98G и T2 была оценена экспрессия генов ростовых факторов *TGFβ1*, *EGF*, *HGF*, *VEGF*, *FGF2(b)*, генов *FAP* и *αSMA*, характерных для клеток мезенхимного происхождения, а также генов белков внеклеточного матрикса *TNC* и *THBS1* (Приложение, Таблица 1).

Мы представили полученные результаты в виде диаграмм сравнения экспрессии генов между двумя давно используемыми линиями A172 и T98G (Рисунок 9 а) и двумя новыми линиями глиобластом R1 и T2 (Рисунок 9 б).

В клетках линий A172 и T98G наиболее были активны гены ростовых факторов *VEGF* и *FGF2(b)*. В клетках A172 экспрессия указанных генов была выше, чем в T98G. Активность гена *TGFβ1* была на одном уровне в клетках обеих линий. Экспрессия гена *HGF* в клетках линии A172 имела низкий уровень, а в клетках T98G не выявлялась. Ген *EGF* был слабо экспрессирован в обеих клеточных линиях. Гены *αSMA* и *THBS1* были высоко активны в обеих линиях, в то время как экспрессия генов *FAP* и *TNC* в клетках линии A172 многократно превышала таковую в клетках T98G.

Клеткам R1 и T2 была свойственна высокая активность генов ростовых факторов *TGFβ1*, *VEGF*, *FGF2(b)* и существенно более низкая активность гена *EGF*. Ген *HGF* в клетках R1 был экспрессирован на более высоком уровне, чем в клетках T2. Обе клеточные линии характеризовались высокой экспрессией генов *THBS1* и *αSMA*. Активность генов *TNC* и *FAP* в клетках R1 была существенно выше, чем в клетках T2.

Таким образом, во всех клеточных линиях отмечена высокая активность генов ростовых факторов *TGFβ1*, *VEGF*, *FGF2(b)*, и низкая активность гена *EGF*. Клеточные линии различались между собой по экспрессии генов, характерных для клеток мезенхимального происхождения, и генов белков матрикса. Активность генов *TNC* и *FAP* в линиях A172 и R1 была выше, чем в клетках T98G и T2.

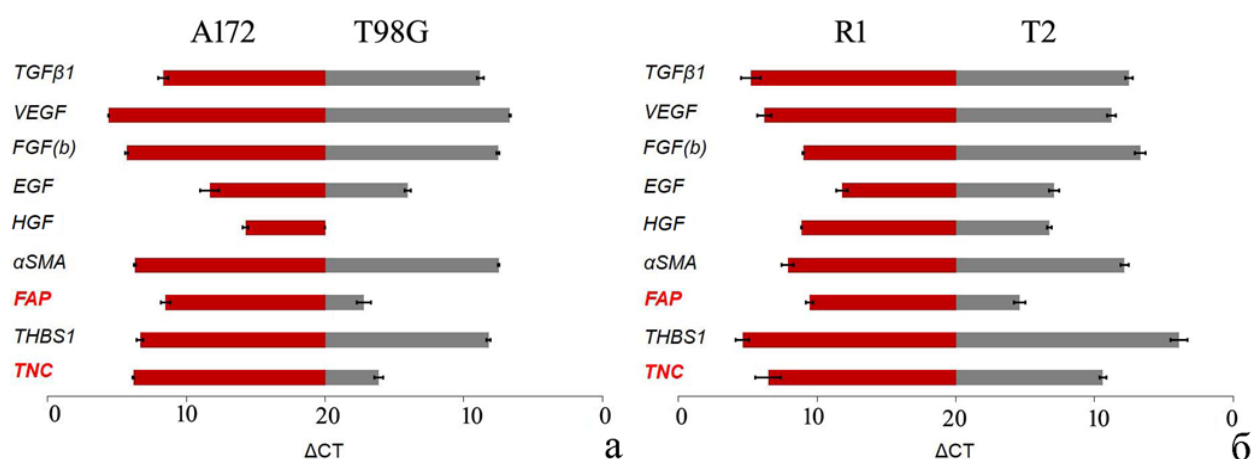


Рисунок 9 — Относительный уровень экспрессии генов в клеточных линиях: A172 и T98G (а), R1 и T2 (б). По оси абсцисс – уровни ΔCT , по оси ординат – названия генов. Горизонтальные отрезки – стандартное отклонение. По шкале абсцисс максимальное значение ΔCT равно 20, что соответствует минимальному значению экспрессии генов (чем ниже ΔCT , тем выше активность генов).

3.5. Воздействие фотемустина на клетки глиобластом

3.5.1. Определение дозовой зависимости действия фотемустина на клеточные линии

Для определения дозовой зависимости действия ФМ на выживаемость клеток глиобластом были использованы линии A172 и T98G, рассматриваемые нами в качестве модели.

Клетки обрабатывали раствором ФМ в концентрациях 0,5–750 мкг/мл и на 7-е сутки определяли количество клеток, снятых с поверхности культивирования. ЛД 50 для клеток линии A172 составила 60 мкг/мл, для линии T98G – 250 мкг/мл (Рисунок 10).

В клеточных линиях A172 и T98G на 7-е сутки после действия ФМ параллельно с подсчетом клеток проводили МТТ тест (Рисунок 10). Сравнение данных, путем подсчета клеток и теста МТТ показало, что МТТ тест не характеризовал количество выживших клеток после действия ФМ в линии T98G относительно интактной линии. Это связано с тем, что после воздействия ФМ клетки линии T98G увеличивались в размере и через 7 сут были больше интактных в несколько раз (увеличивался размер ядра и цитоплазмы). В результате проведения МТТ теста крупные клетки содержали формазан в большем количестве, чем интактные клетки линии T98G.

Таким образом, на основании полученных результатов были выбраны условия для постановки дальнейших экспериментов.

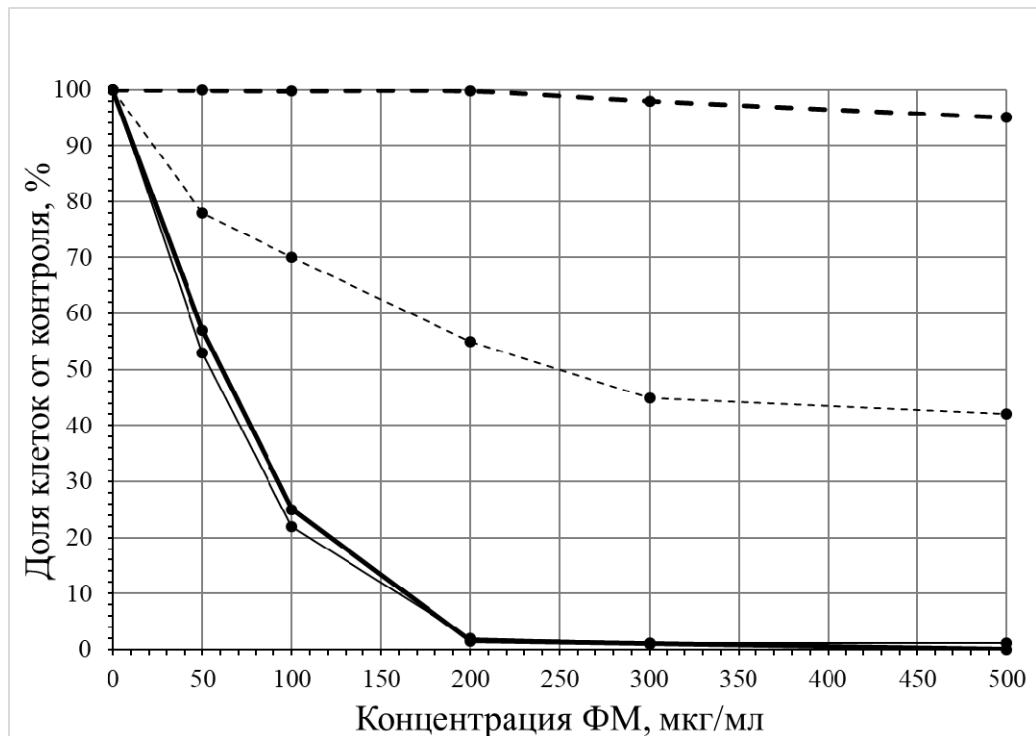


Рисунок 10 — Зависимость действия ФМ на клетки A172 и T98G от его дозы через 7 сут. На рисунке по оси абсцисс указана концентрация ФМ в мкг/мл, по оси ординат — доля клеток после воздействия ФМ в процентах от контроля. Сплошная линия — A172, пунктирная — T98G, жирная линия — метод МТТ, тонкая линия — счет клеток.

3.5.2. Влияние фотемустина на распределение клеток по фазам клеточного цикла

Изменение распределения клеток по фазам клеточного цикла оценивали в линиях A172 и T98G после действия ФМ в сублетальных дозах (50 и 300 мкг/мл, соответственно).

Большинство интактных клеток A172 находились в G₁ (60,92%) и в S (27,94%) фазах, 11,14% клеток были в G₂ фазе клеточного цикла. В клетках линии T98G наблюдалось похожее соотношение: 59,5% клеток находилось в фазе G₁, 33,5% — в фазе S и только 7,0% — в фазе G₂. Через 48 ч после инкубации с ФМ в концентрации 50 мкг/мл в линии A172 в фазе G₂ отмечалось 87,1% клеток; в популяции T98G, обработанной ФМ в концентрации 300 мкг/мл, 93,1% клеток (Рисунок 11).

Таким образом, через 48 ч после воздействия ФМ большинство клеток линий A172 и T98G находилось в фазе G₂.

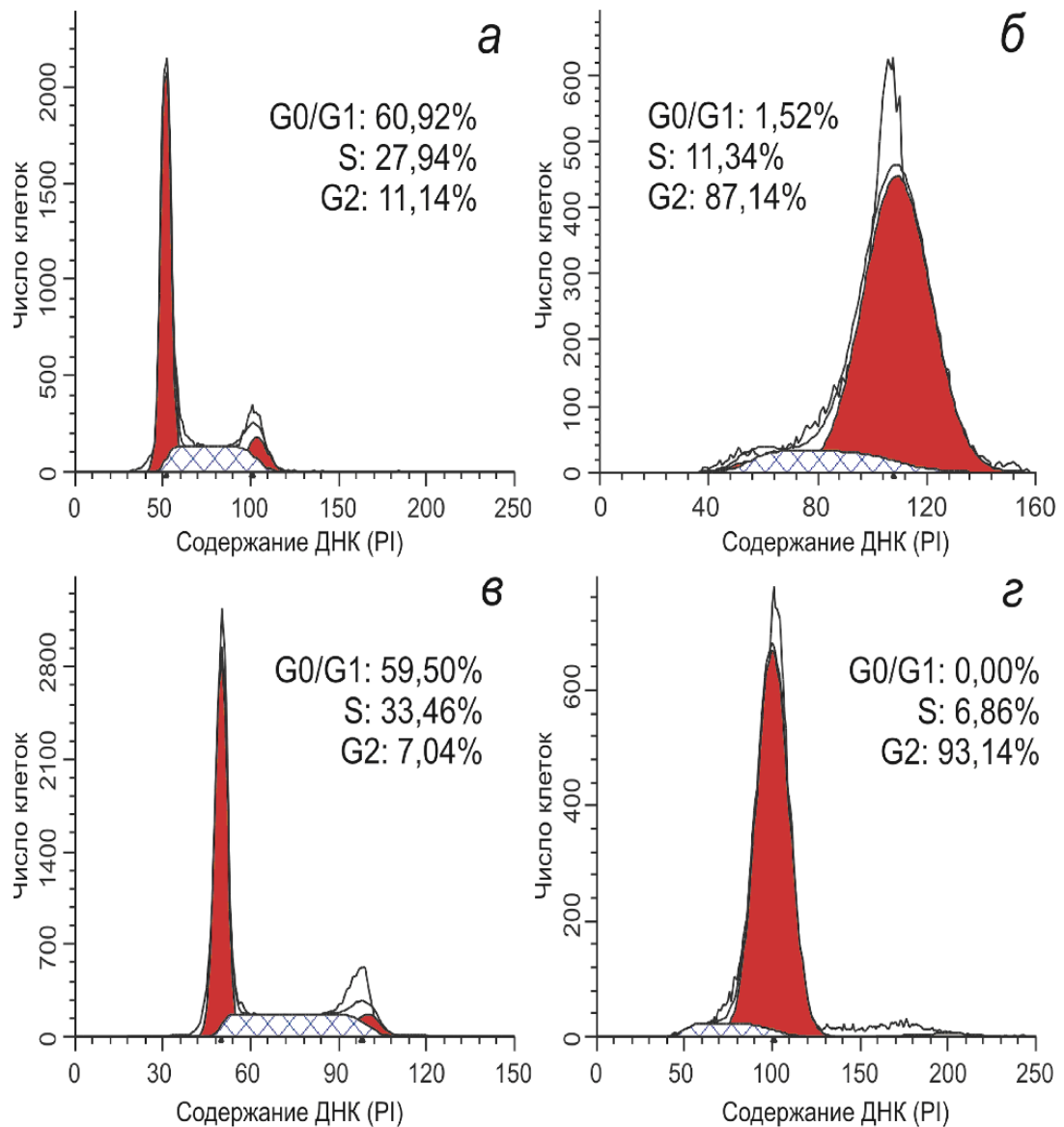


Рисунок 11 — Гистограмма распределения клеток линий A172 (а, б) и T98G (в, г) по фазам клеточного цикла в контроле (а, в) и через 48 ч после действия ФМ (б, г). Концентрация ФМ – 50 мкг/мл (б) и 300 мкг/мл (г). ДНК-цитометрия. По горизонтали – интенсивность флуоресценции пропидия иодида (PI), по вертикали – число клеток.

3.5.3. Воздействие фотемустина на морфологические характеристики клеточных линий глиобластом

Дальнейшие эксперименты проводили как на линиях A172 и T98G, использованных нами ранее для определения дозовой зависимости действия ФМ, так и на новых линиях глиобластом R1 и T2.

Воздействие ФМ приводило к изменению формы клеток во всех линиях. Клетки A172 и R1 через 3 сут после действия препарата в сублетальных дозах (50 и 100 мкг/мл, соответственно) приобретали вытянутую форму с длинными отростками. В культурах отмечали

клетки с фрагментированными ядрами, характерными для поздних стадий апоптоза (Рисунок 12 б, г). В линиях T2 и T98G после действия ФМ появлялись распластанные крупные клетки с одним или несколькими ядрами (Рисунок 12 е, з).

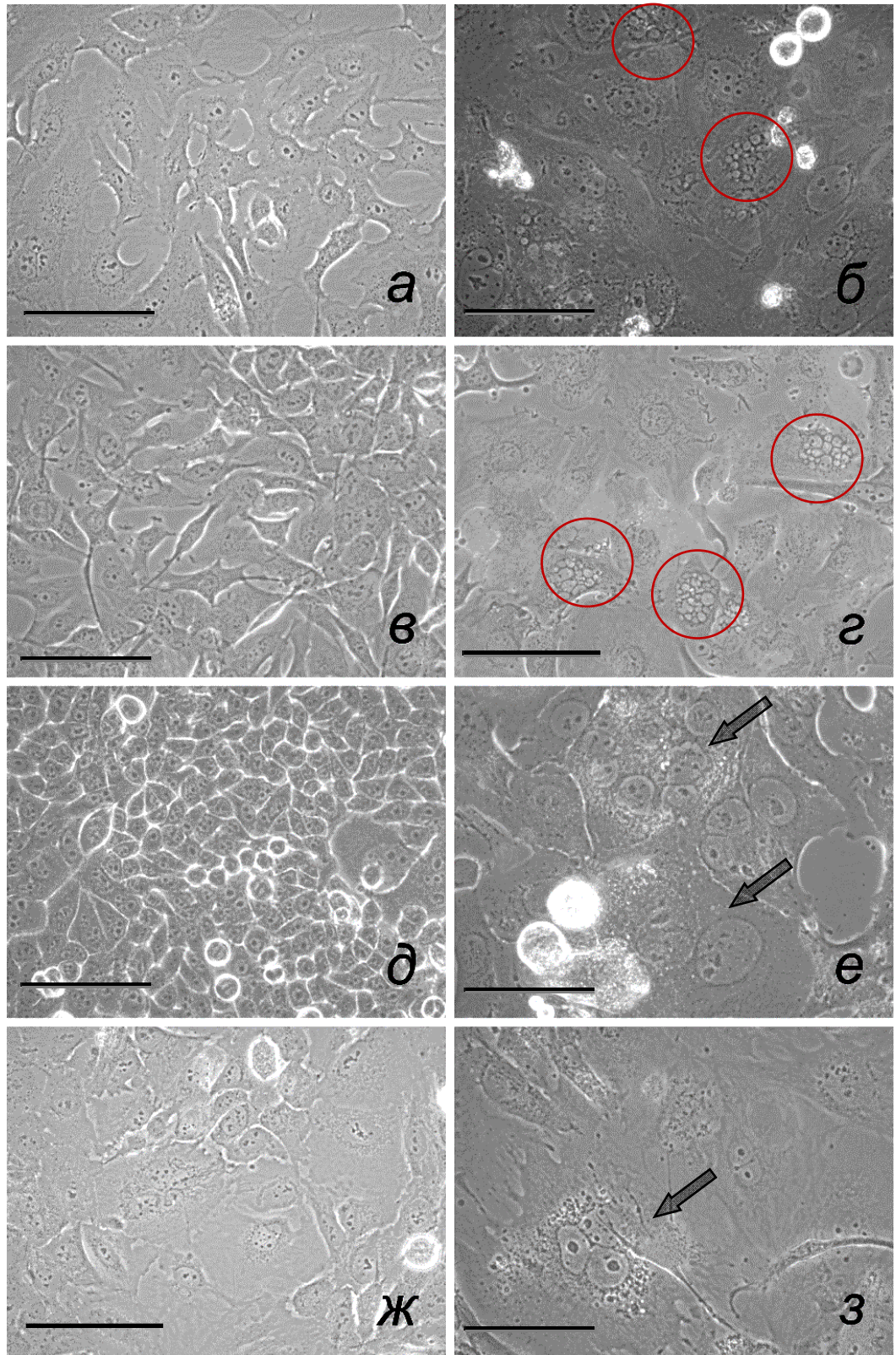


Рисунок 12 — Клетки линий глиобластом A172 (а, б), R1 (в, г), T98G (д, е), T2 (ж, з): а, в, д, ж — контроль; б, г — через 3 сут после воздействия ФМ в концентрации 50 и 100 мкг/мл, соответственно; е, з — через 15 сут после воздействия ФМ в концентрации 300 мкг/мл. Фазовый контраст. Красной линией обозначены фрагментированные ядра. Стрелки указывают на гигантские многоядерные клетки. Масштабные отрезки: 100 мкм.

Таким образом, действие ФМ приводило к изменению морфологии клеток во всех линиях, в линиях T98G и T2 отмечались клетки, обладающие большим размером, превышающим размер интактных клеток в несколько раз.

3.5.4. Эффекты действия фотемустина на выживаемость и пролиферацию клеток глиобластом

При определении дозовой зависимости влияния ФМ на линии A172 и T98G выживаемость клеток оценивали на 7-е сут после инкубации с препаратом. Затем эксперименты были расширены включением повторной обработки клеток ФМ, наблюдения за жизнеспособностью и пролиферативной активностью клеток были продолжены в течение более длительного времени (более 1,5 мес).

Однократная обработка клеток линии A172 ФМ в концентрации 100 мкг/мл вызывала гибель всей культуры к 12-м суткам. При снижении дозы ФМ до 50 мкг/мл часть клеток в популяции сохраняли пролиферативную активность. Такие клетки в дальнейшем изложении обозначаются как резистентные. Резистентные клетки после достижения ими 70%-ного конфлюэнтного монослоя пересевали, а затем снова обрабатывали ФМ. Повторная обработка резистентных клеток раствором ФМ в концентрации 100 мкг/мл не приводила к остановке пролиферации клеточной линии. Увеличение дозы ФМ с 100 до 200 мкг/мл вызывало гибель всей клеточной культуры.

После обработки клеток линии R1 ФМ в концентрации 100 мкг/мл часть клеток погибала, оставшиеся клетки сохраняли способность к пролиферации. Воздействие ФМ в дозе 300 мкг/мл на клетки R1 приводило к гибели всей культуры к 17-м суткам. Повторное действие ФМ в дозе 100 мкг/мл на клетки, пережившие первое воздействие препарата в дозе 100 мкг/мл, не останавливало пролиферацию этих клеток, однако увеличение второй дозы препарата до 300 мкг/мл приводило к их гибели.

Эффекты действия ФМ на выживаемость и пролиферацию клеток в культурах глиобластом суммированы в Таблице 5.

При однократном воздействии на клетки T98G ФМ в концентрации 100 мкг/мл часть клеток погибала, при этом в культуре оставались резистентные, способные к пролиферации, а также непролиферирующие клетки. Увеличение дозы до 200 мкг/мл вызывало неоднозначный

эффект. В одних случаях препарат в этой дозе блокировал пролиферацию, в других часть клеток, способных к пролиферации, сохранялась.

После однократного воздействия ФМ в более высоких дозах (300–750 мкг/мл) в культуре оставались только непролиферирующие клетки, сохранявшие жизнеспособность более 1,5 мес (срок наблюдения) (Рисунок 12 е, з). Такие клетки в дальнейшем изложении обозначаются как переживающие. Эта переживающая популяция была представлена крупными одноядерными и многоядерными клетками. Повторная обработка клеток, перенесших первое воздействие ФМ в дозе 100 мкг/мл, не приводила к остановке пролиферативной активности в линии Т98G, если доза воздействия составляла 300 мкг/мл (Рисунок 13 а). При увеличении дозы ФМ до 400 мкг/мл в культуре Т98G оставались только непролиферирующие переживающие клетки (Рисунок 13 б). Инкубация переживающих клеток Т98G в среде, содержащей 500 мкг/мл ФМ, не оказывала влияния на их жизнеспособность (срок наблюдения 8 суток).

Таблица 5 — Действие фотемустина на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом

Доза ФМ, мкг/мл	Клеточная линия			
	A172	R1	T98G	T2
Первое воздействие ФМ				
50	ПК (16)	ПК (13)	НО	ПК (25)
100	Гибель культуры	ПК (31)	ПК (9)	ПК (46)
300	Гибель культуры	Гибель культуры	ПЖК	ПЖК
750	Гибель культуры	Гибель культуры	ПЖК	ПЖК
Повторное воздействие ФМ *				
100	ПК (19)	ПК (7)	ПК (6)	ПК (26)
200	Гибель культуры	НО	ПК (9)	НО
300	Гибель культуры	Гибель культуры	ПК (14)	ПЖК
400	Гибель культуры	Гибель культуры	ПЖК	НО
500	Гибель культуры	Гибель культуры	ПЖК	НО

Примечание. В скобках указано время (сут) от момента окончания воздействия ФМ до достижения культурой 70%-ного конфлюэнта. * Клетки после первого воздействия 50 мкг/мл для A172, и 100 мкг/мл ФМ для остальных линий культивировали до 70%-ного конфлюэнта, переседали и по достижении 70%-ного конфлюэнта воздействовали повторно; ПК – пролиферирующие клетки, ПЖК – переживающие клетки, НО – не определяли.

Время после повторного действия ФМ, необходимое культурам клеток для достижения 70%-ного конфлюэнтного монослоя, сокращалось по сравнению с первичным воздействием.

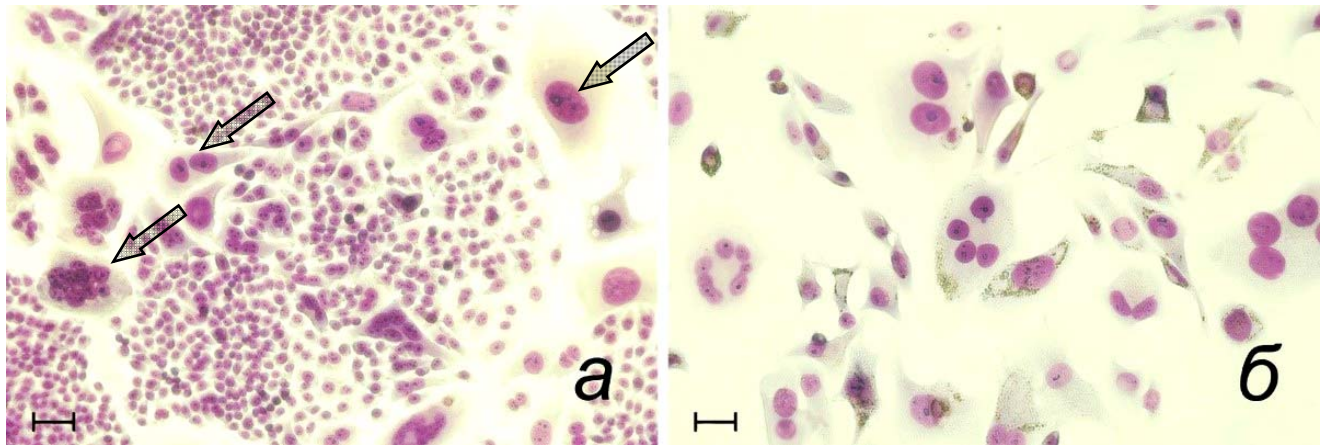


Рисунок 13 — Клетки линии T98G, перенесшие первое воздействие ФМ в дозе 100 мкг/мл и повторное воздействие в дозах 300 мкг/мл (а) или 500 мкг/мл (б) ФМ. Пролиферирующие и переживающие клетки (а), только переживающие клетки (б). Стрелки указывают на крупные одноядерные и многоядерные переживающие клетки. Окраска по Май-Грюнвальду Гимзе. Масштабные отрезки: 100 мкм.

В клетках линии T2 после воздействия ФМ также выявлялись две популяции: пролиферирующие и непролиферирующие клетки. После действия ФМ в дозе 100 мкг/мл в культуре присутствовали обе популяции, при увеличении дозы до 300 мкг/мл оставались только переживающие клетки. При повторном действии ФМ в дозе 100 мкг/мл на резистентные пролиферирующие клетки T2, сохранившиеся после первого воздействия ФМ в дозе 100 мкг/мл, пролиферация клеток сохранялась. При увеличении дозы воздействия до 300 мкг/мл в линии T2 отмечена остановка пролиферативной активности, в культуре оставались непролиферирующие переживающие клетки, сохранявшие жизнеспособность в течение всего срока наблюдения (около 2 мес).

Таким образом, однократная обработка клеток глиобластом ФМ в определенных, разных для каждой линии дозах, приводила к селекции более резистентных популяций клеток, которые были способны выживать и пролиферировать после повторного действия препарата в более высоких дозах. Было обнаружено, что при увеличении дозы ФМ две клеточные линии (A172 и R1) отвечали гибелью всей популяции в течение 3-х недель, тогда как в двух других линиях (T98G и T2) в течение длительного срока сохранялись живые непродлиферирующие переживающие клетки.

3.5.5. Экспрессия поверхностных маркеров на клетках глиобластом после действия фотемустина

Определение поверхностных маркеров на клетках линии A172 проводили после действия ФМ в концентрации 50 мкг/мл, линий R1, T2 и T98G – 100 мкг/мл после двух пассажей культивирования (Таблица 6).

Таблица 6 — Экспрессия поверхностных маркеров на пролиферирующих клетках линий глиобластом после действия фотемустина

Маркер	Доля позитивных клеток, %			
	A172	T98G	R1	T2
	Мезенхимные маркеры			
CD29	99,6±0,2	99,3±0,2	98,6±0,5	99,7±0,2
CD44	99,6±0,2	99,7±0,2	99,3±0,2	99,6±0,3
CD73	82,6±2,0	97,1±1,0	95,9±1,5	99,7±0,2
CD90	42,2±2,5	0,4±0,1	32,7±1,5	27,1±3,0
CD105	84,2±0,5	0,3±0,1	50,3±1,4	65,5±3,5
CD166	99,3±0,3	99,8±0,2	83,7±1,4	97,4±1,6
	Нейрональные маркеры			
CD133/2	20,6±1,9	0,3±0,1	15,2±1,5	0,3±0,1
	Другие маркеры			
CD146	98,2±0,5	99,7±0,2	35,6±2,3	96,4±3,1
CD147	99,7±0,2	98,7±0,2	98,4±0,2	99,2±0,2
CD151	90,8±0,8	99,7±0,2	97,7±0,2	98,6±0,2

После воздействия ФМ более 98% клеток всех линий экспрессировали мезенхимные маркеры CD29, CD44, CD166. Маркеры CD90 и CD105 в интактных линиях A172 и T2 были

представлены на большинстве клеток, однако после действия ФМ было отмечено значительное снижение доли CD90 позитивных клеток в обеих клеточных линиях: A172 с $62,4 \pm 2,2$ до $42,2 \pm 2,5\%$, в T2 с $70,4 \pm 1,9$ до $27,1 \pm 3,0\%$. Доли CD105 позитивных клеток в этих линиях значительно не изменились и составили $84,2 \pm 0,5\%$ в A172, $65,5 \pm 3,5\%$ в R1, по сравнению с контролем $75,2 \pm 3,5$ и $70,4 \pm 1,6\%$, соответственно. После воздействия ФМ доля CD90 позитивных клеток в линии R1 составила $32,7 \pm 1,5\%$, CD105 позитивных клеток $50,3 \pm 1,4\%$, по сравнению с интактной линией $25,3 \pm 2,0$ и $28,8 \pm 2,2\%$, соответственно. На сохранившихся пролиферирующих клетках линии T98G маркеры CD90 и CD105 выявлены не были. Антиген CD146 присутствовал более, чем на 90% клеток T98G, T2 и A172, как в интактных популяциях, так и после воздействия ФМ. В интактной линии R1 этот маркер был экспрессирован на $74,9 \pm 2,3\%$ клеток, после действия ФМ доля CD146 позитивных была значительно снижена и составила $35,6 \pm 2,3\%$. В линиях T2 и T98G после воздействия ФМ не было отмечено популяций клеток, несущих CD133/2. В составе линии A172 после действия ФМ отмечали увеличение доли CD133/2 позитивных клеток с $9,0 \pm 3,0$ до $20,6 \pm 1,9\%$. В R1 доля CD133/2 позитивных клеток составила $15,2 \pm 1,5\%$, по сравнению с $20,0 \pm 3,2\%$ в интактной линии. Маркеры CD147 и CD151 были экспрессированы более, чем в 90% клеток всех исследуемых линий.

Таким образом, действие ФМ в сублетальных дозах приводило к изменениям в соотношении клеточных популяций в исследуемых линиях. Основные изменения относились к популяциям клеток, экспрессирующим CD90, в линии T2, CD90 и CD133/2 – в линии A172, CD146, CD133/2, CD105 – в линии R1 (Рисунок 17).

Представленные результаты были получены на клеточных популяциях, подвергнутых действию ФМ в сублетальных дозах, после двух пассажей культивирования. Поскольку переживающие клетки не обладали пролиферативной активностью, то в результате двух пересевов в культурах T98G и T2 были представлены преимущественно пролиферирующие клетки, переживающие клетки не входили в анализируемые популяции.

После действия ФМ в дозе 300 мкг/мл в культурах T98G и T2 отмечались исключительно непролиферирующие переживающие клетки (Таблица 4, Рисунок 12 е, з). Определение поверхностного фенотипа переживающих клеток проводили на клетках линии T98G через 12 сут после воздействия ФМ в дозе 300 мкг/мл.

Переживающие клетки линии T98G высоко экспрессировали мезенхимные маркеры CD29, CD44, CD73. Маркер CD90 был экспрессирован на $0,9 \pm 0,2\%$ клеток, CD105 выявлен не был (Таблица 7, Рисунок 14). Доли клеточных популяций, несущих маркеры CD147 и CD151, были меньше, чем в контроле и составили соответственно $91,5 \pm 0,1$ и $82,7 \pm 0,2\%$. На переживающих клетках, как и на интактных клетках, не отмечали экспрессии маркера CD133/2.

Основные изменения в экспрессии маркеров на переживающих клетках T98G по сравнению с интактными клетками были отмечены в популяциях, несущих CD146 и CD166. В интактной линии маркер CD146 несли $98,2 \pm 1,3\%$ клеток, в переживающих популяциях этот маркер экспрессировали только $66,0 \pm 0,8\%$ клеток. Антиген CD166 в интактной линии экспрессировали $99,3 \pm 0,2\%$ клеток, в популяциях переживающих клеток этот маркер несли $68,5 \pm 0,5\%$ клеток.

Таким образом, переживающие клетки линии T98G высоко экспрессировали поверхностные маркеры CD29, CD44, CD73, CD147, CD151. Доля клеток, экспрессирующих маркеры CD146 и CD166, в переживающих популяциях была ниже, чем в интактной линии T98G.

Таблица 7 — Экспрессия поверхностных маркеров на переживающих клетках линии T98G после действия фотемустина в сравнении с интактными клетками

Маркер	Доля позитивных клеток, %	
	Интактные клетки	ПЖК
Мезенхимные маркеры		
CD29	$98,5 \pm 1,1$	$95,2 \pm 0,2$
CD44	$99,6 \pm 0,2$	$98,8 \pm 0,2$
CD73	$74,2 \pm 2,5$	$80,7 \pm 0,5$
CD90	$1,3 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$
CD105	$0,3 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$
CD166	$99,3 \pm 0,2$	$68,5 \pm 0,5$
Нейрональные маркеры		
CD133/2	$0,8 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,6$
Другие маркеры		
CD146	$98,2 \pm 1,3$	$66,0 \pm 0,8$
CD147	$99,6 \pm 0,2$	$91,5 \pm 0,1$
CD151	$99,5 \pm 0,2$	$82,7 \pm 0,2$

Примечание. ПЖК – переживающие клетки

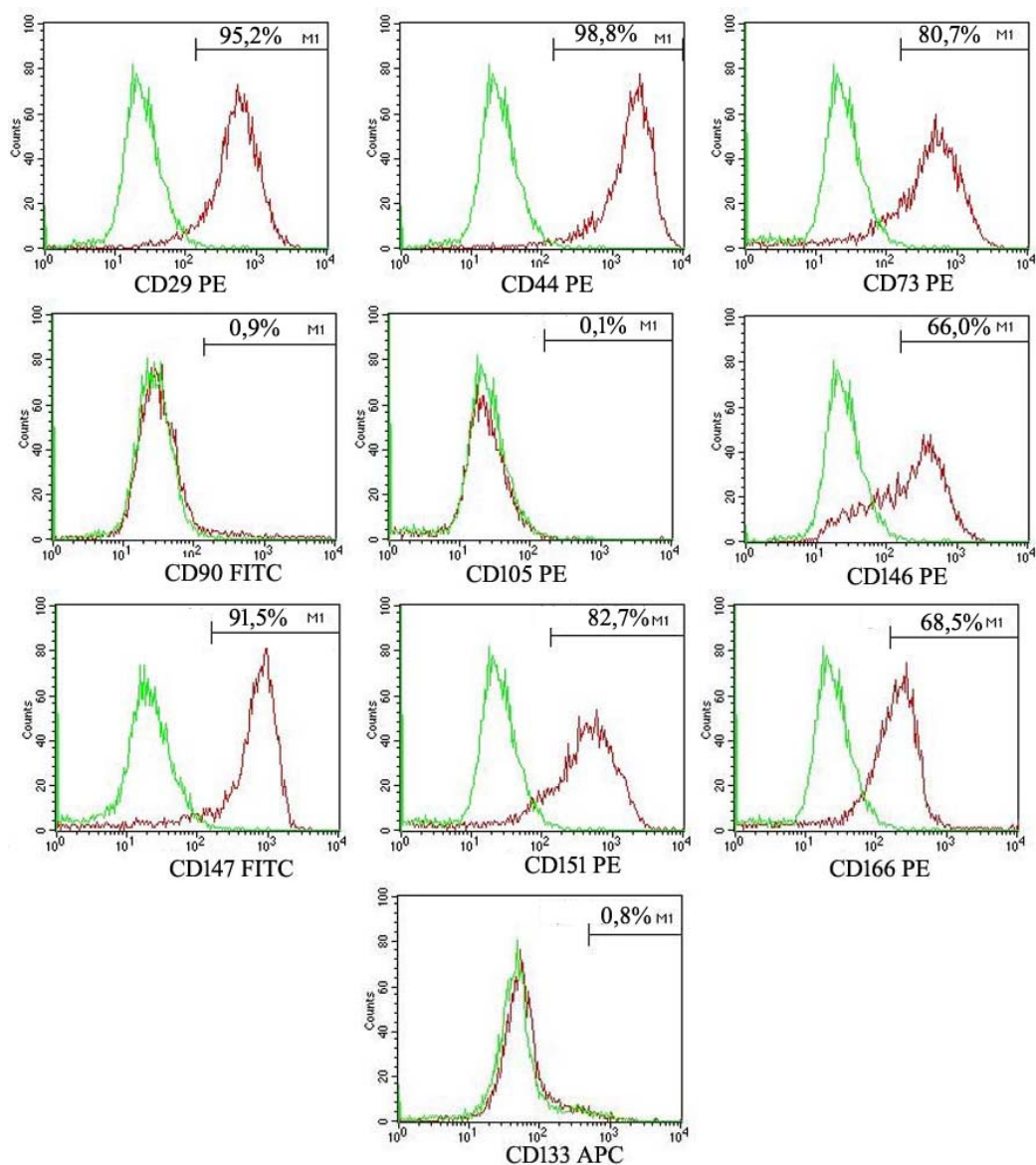


Рисунок 14 — Гистограммы распределения экспрессии поверхностных маркеров переживающих клеток линии T98G, выявленные при иммуноцитофлуориметрическом анализе. Над каждой гистограммой указана доля клеток в % (среднее арифметическое), несущих соответствующий антиген, по сравнению с изотипическими контролями. По горизонтали — интенсивность флуоресценции (усл. ед.), по вертикали — число событий. Зеленая линия — изотипический контроль. Порог для отсекаания позитивных клеток указан отрезком M1.

3.5.6. Исследование активности генов в клетках глиобластом, подвергнутых действию фотемустина

В клетках линий глиобластом A172, R1, T2 и T98G, подвергнутых действию ФМ, оценена активность генов ростовых факторов *TGFβ1*, *EGF*, *VEGF*, *FGF2(b)*, *HGF*, генов *FAP* и *αSMA*, характерных для мезенхимных клеток, генов белков внеклеточного матрикса *TNC* и *THBS1*, а также гена транскрипционного фактора *Zeb1*.

Клетки после однократного воздействия ФМ, сохраняющие пролиферативную активность, исследовали после пересева и восстановления ими 70%-ного конфлюэнтного монослоя. Из переживающих клеток T98G и T2 мРНК выделяли через 21–30 сут после действия ФМ.

После воздействия ФМ в концентрации 50 мкг/мл значительная часть клеток A172 и R1 погибала. В клетках линии A172 после инкубации с ФМ происходило снижение активности генов *TGFβ1*, *EGF*, *VEGF*, *THBS1*, *FAP*, *TNC* и *Zeb1*. В клетках R1 была снижена экспрессия генов *HGF* и *EGF* (Приложение, Таблица 2; Рисунок 15а).

После действия ФМ в дозе 100 мкг/мл линии T98G и T2 представляли собой сочетание двух популяций – пролиферирующих и непролиферирующих переживающих клеток. В переживающих клетках экспрессия большинства генов оказалась увеличенной. В клетках линии T98G было выявлено усиление активности генов *HGF*, *FGF2(b)*, *THBS1*, *FAP* и *TNC*, а в клетках T2 – генов *VEGF*, *FAP* и *TNC* (Приложение, Таблица 3; Рисунок 15б).

Увеличение дозы препарата до 300 мкг/мл приводило к присутствию в клеточных линиях только переживающих клеток и сопровождалось усилением экспрессии генов. Увеличение активности было наиболее выражено для генов *FAP* и *TNC*, по уровню экспрессии которых клетки T98G и T2 более всего отличались от A172 и R1. Кроме того, в переживающих клетках T98G многократно возрастала экспрессия генов *HGF* и *THBS1*, а в клетках T2 – гена *VEGF*. Активность остальных генов была также в разной степени увеличена (Приложение, Таблица 4; Рисунок 15в).

Таким образом, после действия ФМ на линии глиобластом T98G и T2 в них длительное время сохранялись популяции переживающих клеток, которые обладали повышенной по сравнению с исходной популяцией активностью ряда генов ростовых факторов, генов белков внеклеточного матрикса и генов, ассоциированных с мезенхимным фенотипом.

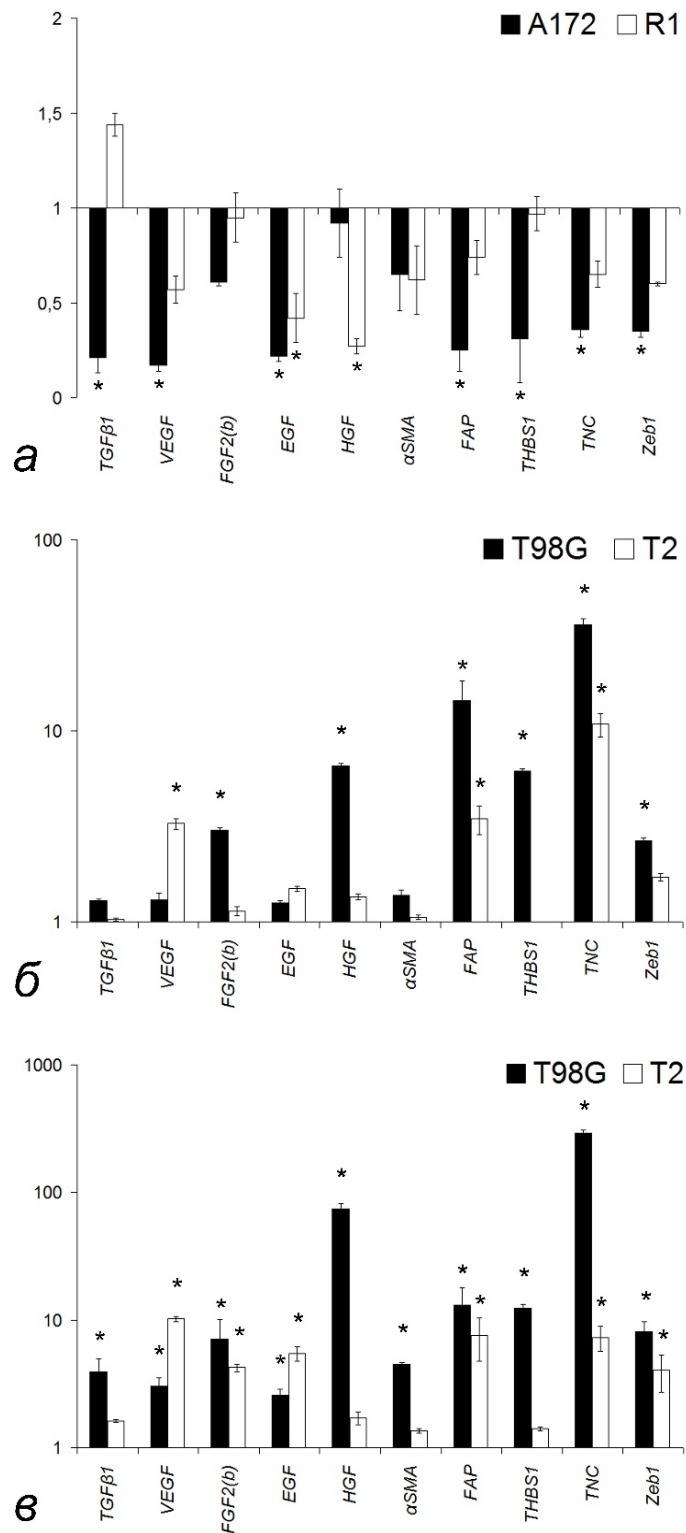


Рисунок 15 — Изменение экспрессии генов после однократного воздействия ФМ в концентрации: (а) 50 мкг/мл в клетках линий A172 и R1, (б) 100 мкг/мл в клетках линий T98G и T2, (в) 300 мкг/мл в клетках линий T98G и T2. По горизонтали – исследуемые гены, по вертикали – $2^{-\Delta\Delta CT}$ (среднее арифметическое). * – Различие достоверно при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни). Вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

3.6. Эффекты воздействия ионизирующего излучения на клетки глиобластом

3.6.1. Влияние облучения на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом

Однократное облучение линий A172, R1, T98G и T2 в дозе 10 Гр приводило к морфологическим изменениям клеток. В культурах A172 и R1 на 3–7 день после воздействия наряду с гибелью части клеток выявлялись немногочисленные многоядерные клетки. На 2-й нед после воздействия отмечались популяции пролиферирующих клеток.

В клетках линий T98G и T2 отмечались популяции пролиферирующих клеток и увеличение числа крупных одноядерных и многоядерных клеток.

Время, необходимое культурам облученных клеток для достижения 70%-ного конфлюэнтного монослоя, различалось для отдельных линий. После облучения в дозе 10 Гр это время составляло 8 сут для клеток T98G и 26 сут для клеток T2, для клеток линий A172 и R1 – 15 и 22 сут, соответственно (Таблица 8). Таким образом, после однократного облучения в дозе 10 Гр во всех линиях клетки сохраняли пролиферативную активность.

Таблица 8 – Влияние облучения на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом

Линия	Суммарная доза облучения с указанием разовой [в скобках], Гр				
	10	36 [2]	50 [2]	60 [5]	10 + 20 *
A172	ПК (15)	ПК (18)	Гибель культуры	Гибель культуры	Гибель культуры
R1	ПК (22)	ПК (26)	Гибель культуры	НО	НО
T98G	ПК (8)	НО	ПК (13)	ПЖК	ПЖК
T2	ПК (26)	ПЖК	ПЖК	НО	НО

Примечание. В скобках указано время (сут) от момента окончания облучения до достижения культурой 70%-ного конфлюэнта. * Клетки после первого облучения в дозе 10 Гр культивировали до 70%-ного конфлюэнта, переседали и после достижения 70%-ного конфлюэнта облучали повторно в дозе 20 Гр; ПК – пролиферирующие клетки, ПЖК – переживающие клетки, НО – не определяли.

Фракционированное облучение в дозе 36 Гр не останавливало пролиферацию клеток в линиях A172 и R1 (Рисунок 16 б, г). Достижение 70%-ного конфлюэнта в этих культурах происходило медленнее, чем после однократного облучения в дозе 10 Гр (Таблица 9).

Увеличение дозы фракционированного облучения до 50 Гр приводило к гибели клеточных культур A172 и R1 в течение 10–14 сут.

Линии глиобластом T98G и T2 были более устойчивы к действию облучения. Клеточная популяция T98G после облучения в суммарной дозе 50 Гр представляла собой сочетание пролиферирующих клеток с крупными непролиферирующими одноядерными и многоядерными клетками (Рисунок 16 е). Нарастание клеток T98G до 70%-ного конфлюэнта после облучения в дозе 50 Гр происходило дольше, чем после однократного облучения в дозе 10 Гр (Таблица 8). Облучение в дозе 60 Гр приводило к остановке пролиферативной активности в линии T98G, в культуре сохранялись только переживающие клетки (Рисунок 16 ж).

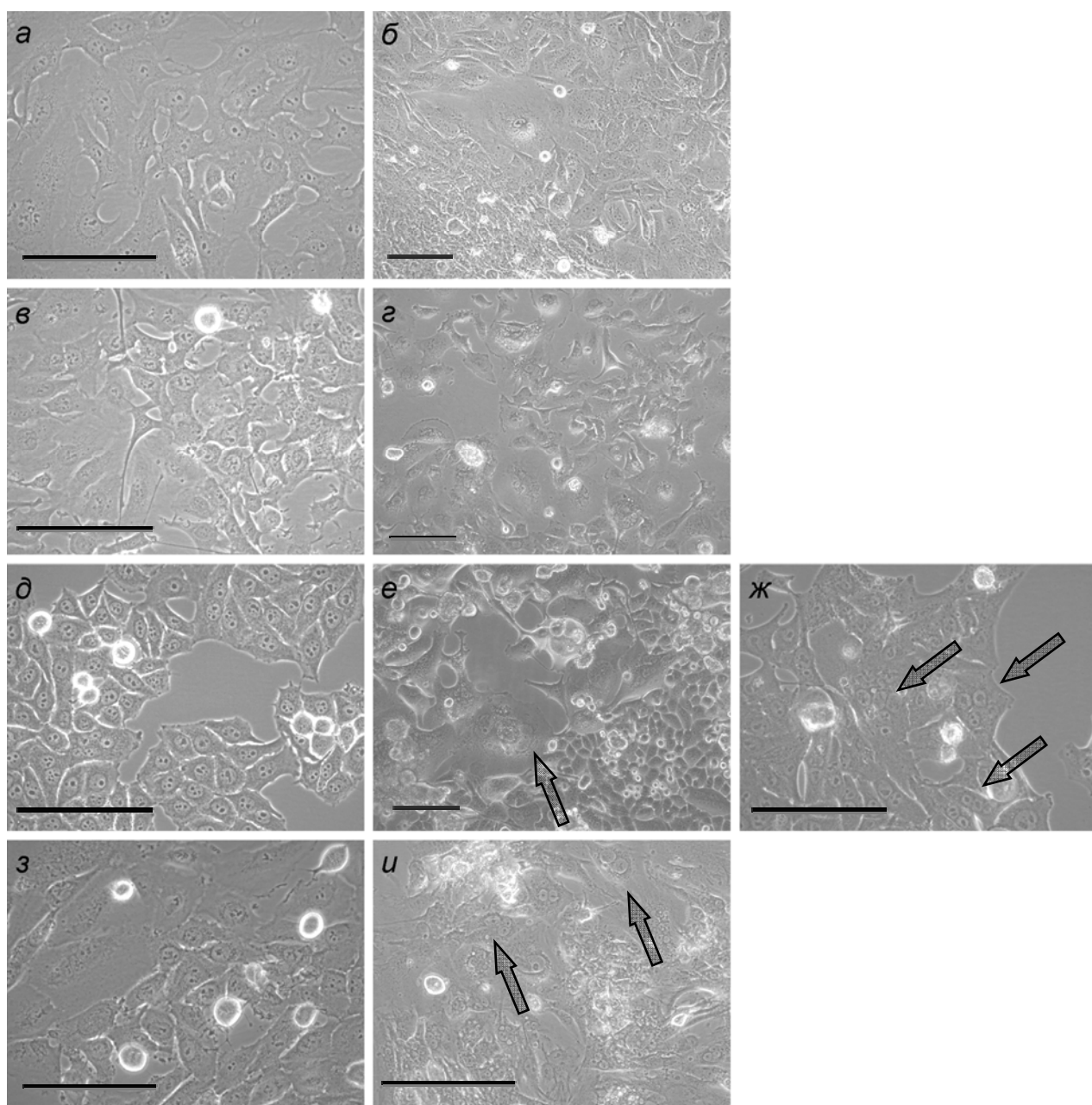


Рисунок 16 — Клетки линий A172 (а, б), R1 (в, г), T98G (д, е, ж), T2 (з, и): а, в, д, з — контроль; б, г, и — после фракционированного облучения в суммарной дозе 36 Гр; е — после фракционированного облучения в суммарной дозе 50 Гр; ж — после фракционированного облучения в суммарной дозе 60 Гр. Фазовый контраст. Стрелки указывают на многоядерные клетки. Масштабные отрезки: 100 мкм.

Действие повторного облучения исследовали на клетках линий T98G и A172. Клетки, которые сохраняли способность к пролиферации после первого облучения в дозе 10 Гр, культивировали до 70%-ного конфлюэнта. После пересева по достижении 70%-ного конфлюэнта клетки облучали повторно в дозе 20 Гр. Повторное облучение приводило к гибели клеточной культуры A172, в культуре T98G оставались только непролиферирующие клетки.

3.6.2. Экспрессия поверхностных маркеров на клетках глиобластом после облучения

Влияние ионизирующего излучения на популяционный состав клеточных линий A172, R1, T98G и T2 оценивали после облучения клеток в дозе 10 Гр (Таблица 9, Рисунок 17).

Таблица 9 — Экспрессия поверхностных маркеров на пролиферирующих клетках глиобластом после облучения в дозе 10 Гр

Маркер	Доля позитивных клеток, %			
	A172	T98G	R1	T2
Мезенхимные маркеры				
CD29	99,2±0,1	97,3±0,2	99,4±0,1	99,5±0,2
CD44	99,4±0,3	99,4±0,2	99,6±0,2	99,6±0,2
CD73	77,8±0,9	83,2±1,2	92,2±1,2	99,7±0,2
CD90	64,4±0,8	0,5±0,2	38,7±2,6	60,0±3,0
CD105	84,3±2,9	0,4±0,1	19,7±1,0	72,2±2,0
CD166	98,9±0,3	97,9±0,3	90,0±2,0	98,4±0,2
Нейрональные маркеры				
CD133/2	20,1±2,6	0,5±0,2	20,7±1,0	0,3±0,1
Другие маркеры				
CD146	96,2±0,3	98,5±0,5	81,8±2,0	98,4±0,4
CD147	99,3±0,3	99,0±0,2	99,6±0,1	98,5±0,2
CD151	97,3±0,3	98,4±0,2	98,9±0,2	98,6±0,2

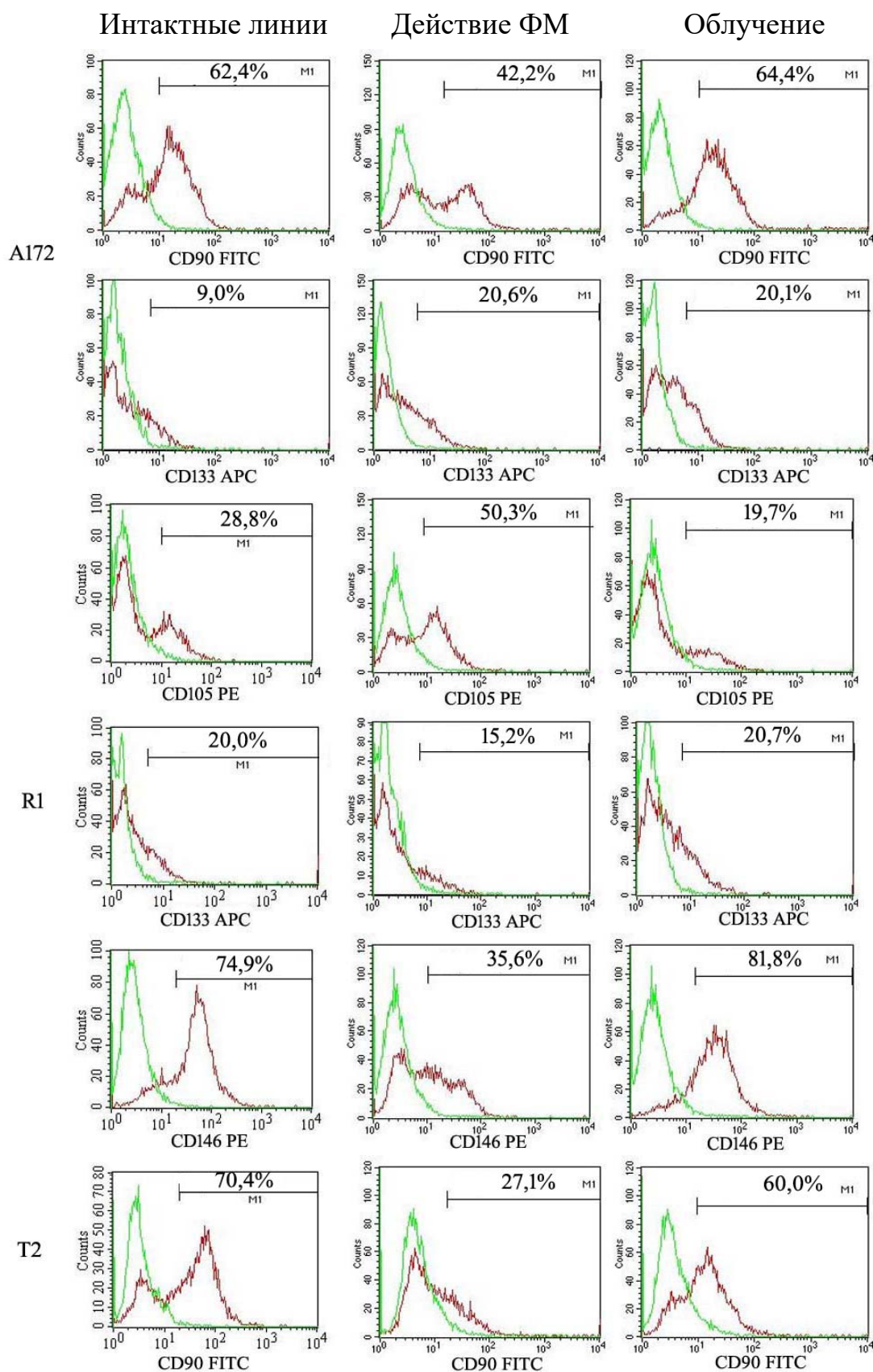


Рисунок 17 — Гистограммы распределения экспрессии поверхностных маркеров клеток глиобластом после действия ФМ в сублетальных дозах и облучения в дозе 10 Гр по сравнению

с интактными клетками, выявленные при иммуноцитофлуориметрическом анализе. Над каждой гистограммой указана доля клеток в % (среднее арифметическое), несущих соответствующий антиген. По горизонтали – интенсивность флуоресценции (усл. ед.), по вертикали – число событий. Зеленая линия – изотипический контроль. Граница отсека позитивных клеток указана отрезком M1.

Результаты, полученные после двукратного пересева облученных клеток, отражали состояние популяций пролиферирующих клеток. Переживающие клетки в линиях T2 и T98G не входили в анализируемые популяции.

Во всех линиях более 95% пролиферирующих клеток экспрессировали мезенхимные маркеры CD29, CD44, CD166. Экспрессия маркера CD90 в линии A172 соответствовала контролю. В линии T2 отмечено небольшое снижение доли клеток, экспрессирующих CD90 с $70,4 \pm 1,9$ до $60,0 \pm 3,0\%$. Доля CD105 позитивных клеток в линиях A172 и T98G была такой же, как в контроле. В культуре R1 отмечено увеличение доли клеток, экспрессирующих CD90 по сравнению с интактной линией с $25,3 \pm 2,0$ до $38,7 \pm 2,6\%$, и снижение CD105 позитивных клеток с $28,8 \pm 2,2$ до $19,7 \pm 1,0\%$. В линии T98G не было отмечено клеток, несущих маркеры CD90 и CD105. После облучения в линии A172 доля клеток, экспрессирующих нейрональный маркер CD133/2, была увеличена по сравнению с контролем с $9,0 \pm 3,0$ до $20,1 \pm 2,6\%$. В линии R1 доля CD133/2 позитивных клеток была такой же как в контроле и составила $20,7 \pm 1,0\%$. В линиях T2 и T98G не было отмечено популяций клеток, экспрессирующих CD133/2.

Антиген CD146 присутствовал более, чем на 95% клеток A172, T98, T2, в линии R1 этот маркер экспрессировали $81,8 \pm 2,0\%$ клеток, по сравнению с интактной линией, где этот маркер несли $74,9 \pm 2,3\%$ клеток. Маркеры CD147 и CD151 были экспрессированы более чем на 95% клеток всех линий.

Таким образом, облучение в дозе 10 Гр не приводило к значительным изменениям в соотношении клеточных популяций в исследуемых клеточных линиях. Основные изменения относились к популяциям клеток, экспрессирующим маркер CD90, в линии T2, CD133/2 – в линии A172, CD105 и CD146 – в линии R1.

3.6.3. Исследование активности генов в клетках глиобластом после разных доз облучения

В популяциях клеток линий A172, R1, T98G и T2, подвергнутых облучению, была проведена оценка активности генов ростовых факторов (*TGFβ1*, *EGF*, *VEGF*, *FGF(b)*, *HGF*), генов белков внеклеточного матрикса (*TNC* и *THBS1*), генов белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения (*FAP* и *αSMA*), а также гена транскрипционного фактора *Zeb1*.

Клетки, облученные однократно, двукратно, а также во фракционированном режиме, сохранявшие пролиферативную активность, исследовали после однократного пересева и достижения 70%-ного конфлюэнтного монослоя. Из переживающих клеток линий T98G и T2, облученных во фракционированном режиме, мРНК выделяли через 30–40 сут после последнего сеанса облучения.

В клетках линий A172 и R1 после однократного облучения в дозе 10 Гр активность большинства исследованных генов была в пределах значений, характерных для интактных клеток. Исключение составляла экспрессия гена *HGF*, сниженная в облученных клетках R1, и активность гена *α SMA*, увеличенная в клетках A172 (Приложение, Таблица 5; Рисунок 18а). В клетках T98G и T2, облученных однократно в дозе 10 Гр, экспрессия большинства генов проявляла тенденцию к увеличению. В обеих клеточных линиях была усилена активность генов *FAP* и *Zeb1*, в клетках T2 возрастала экспрессия генов *VEGF* и *TNC* (Приложение, Таблица 6; Рисунок 18б).

Фракционированное облучение клеток A172 и R1 в суммарной дозе 36 Гр приводило к снижению активности гена *TNC* в обеих клеточных линиях, и генов *TGF β 1* и *HGF* в клетках R1. Экспрессия *α SMA* в клетках A172 была повышена. Активность других исследованных генов оставалась в пределах, характерных для интактных клеток. Таким образом, тенденции изменения активности генов, отмеченные после облучения в дозе 10 Гр, усилились при фракционированном облучении в дозе 36 Гр (Приложение, Таблица 7; Рисунок 18 в).

В клетках T98G, облученных фракционировано в суммарной дозе 50 Гр, активность всех генов, кроме *α SMA* и *TGF β 1*, была увеличена по сравнению с интактными клетками (Приложение, Таблица 8; Рисунок 18 г). Клетки T2 при достижении дозы 36 Гр прекращали пролиферацию, однако гибель культуры не наступала, так как значительная часть популяции сохранялась в виде крупных непролиферирующих переживающих клеток (Рисунок 16 и). При увеличении суммарной дозы до 50 Гр эта клеточная популяция не погибала и сохраняла жизнеспособность 36–40 дней (срок наблюдений). В клетках линии T2 после окончания облучения в дозе 50 Гр уровень экспрессии генов *VEGF*, *EGF*, *FGF(b)*, *TNC*, *FAP* и *Zeb1* был увеличен (Рисунок 18 г).

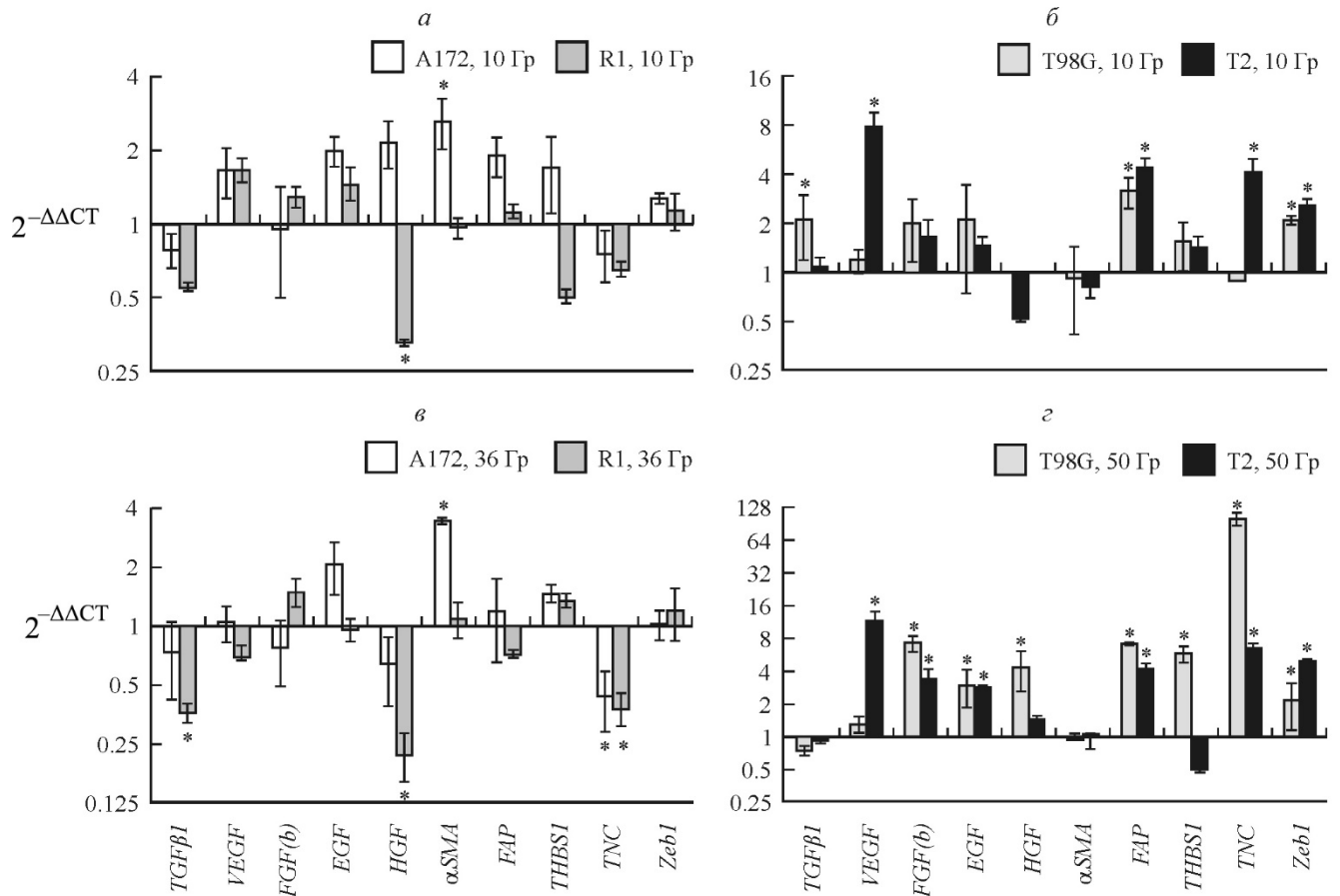


Рисунок 18 — Изменение экспрессии генов в клетках линий A172, R1 (а, в), T98G и T2 (б, г) после однократного облучения в дозе 10 Гр (а, б), после фракционированного облучения в суммарной дозе 36 Гр (в), после фракционированного облучения в суммарной дозе 50 Гр (г). По горизонтали – исследуемые гены; по вертикали – $2^{-\Delta\Delta CT}$. Экспрессия генов в интактных клетках принята за единицу; * – достоверность различия при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни); вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

Клетки T98G, подвергнутые действию двукратного облучения представляли собой популяции переживающих клеток, которые сохраняли жизнеспособность более месяца (срок наблюдения). Через 30 дней после повторного облучения в популяциях клеток T98G активность всех исследованных генов была усилена. Максимальная активация была отмечена для генов *HGF*, *FAP* и *TNC* (Приложение, Таблица 9; Рисунок 19 а).

Таким образом, после воздействия ионизирующего излучения в высоких дозах в линиях T98G и T2 сохранялись популяции переживающих клеток, которые обладали повышенной по сравнению с исходной популяцией активностью генов ряда факторов, участвующих в прогрессии опухолей.

Сопоставление профилей активности генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и белков, характерных для клеток мезенхимального происхождения, в

популяциях переживающих клеток T2 и T98G после облучения в высоких дозах, продемонстрировало их значительное совпадение с профилем экспрессии тех же генов после действия ФМ (Рисунок 19 а, б).

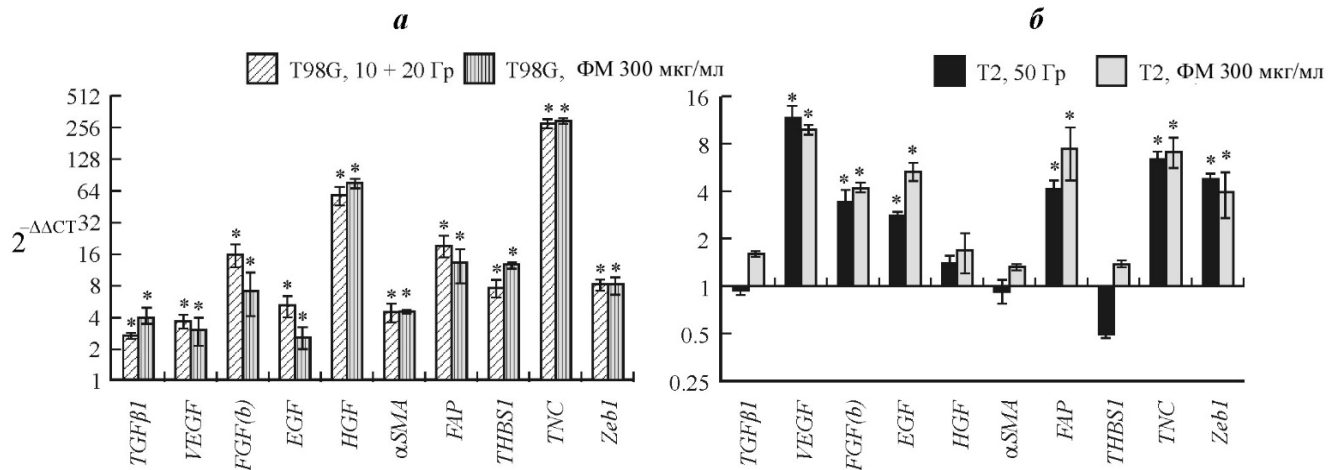


Рисунок 19 — Изменение экспрессии генов в клетках линий T98G (а) и T2 (б) после двукратного облучения 10+20 Гр (а), после фракционированного облучения в суммарной дозе 50 Гр (б), после воздействия ФМ в дозе 300 мкг/мл (а, б). По горизонтали – исследуемые гены; по вертикали – $2^{-\Delta\Delta CT}$ (кратность разницы между экспрессией гена в клетках после генотоксических воздействий и интактных клетках). Экспрессия генов в интактных клетках принята за единицу; * – достоверность различия при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни); вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема рецидивов глиобластом после стандартного лечения остается не решенной до настоящего времени. Для глиобластом характерна высокая степень гетерогенности, эти опухоли различаются по морфологии, фенотипу, молекулярно-генетическим особенностям клеток и ответу на терапию. При этом каждая глиобластома обладает гетерогенностью внутри опухоли и сформирована популяциями клеток, обладающими различными характеристиками. Современные исследования свидетельствуют, что клетки, инициирующие рост глиобластом – стволовые опухолевые клетки – способны к самовоспроизведению, обладают замедленным клеточным циклом, эффективной системой репарации и высокой устойчивостью к действию генотоксических факторов. Однако, проблема идентификации таких клеток связана с высокой гетерогенностью глиобластом. Исследования гетерогенности глиобластом привели к созданию классификации, основанной на молекулярно-генетических особенностях глиобластом и выживаемости пациентов. Эта классификация глиобластом включает такие признаки, как мутации генов белков онкосупрессоров p53 и PTEN, ряда ростовых факторов и рецепторов к ним, а также мезенхимальные или нейральные маркеры [Verhaak R.G. et al., 2010]. Определение подтипа глиобластом связано с рядом сложностей и требует большого количества молекулярно-генетических исследований. В настоящее время поиск прогностических маркеров и новых стратегий в лечении глиобластом не теряет своей актуальности.

В нашей работе в качестве модели глиобластомы применялись две широко используемые клеточные линии глиобластом A172 и T98G, выделенные еще в 70-х годах. Эти линии были выбраны для исследования, поскольку известно, что они различаются между собой по нарушениям ряда сигнальных путей, мутациям генов онкосупрессоров p53 и PTEN, экспрессии MGMT, ряда ростовых факторов, а также по чувствительности к действию облучения и химиопрепаратов [Birocco A. et al., 1999; Melendez B. et al., 2011; Akiyama Y. et al., 2014]. Поскольку большой интерес представляют новые клеточные культуры глиобластом, отражающие гетерогенность этих опухолей, мы исследовали две новые линии R1 и T2, выделенные из опухолей пациентов с подтвержденным диагнозом «глиобластома». В качестве генотоксических факторов воздействия на клетки применяли химиотерапевтический препарат фотемустин и фотонное облучение, используемые для лечения пациентов с глиобластомами.

Как давно используемые, так и новые клеточные линии отличались между собой по морфологии и фенотипу и представляли собой гетерогенные популяции клеток. По ответу на действие облучения или ФМ линии A172 и R1 обладали сходством, аналогично, как и линии T2 и T98G. После воздействия ФМ или облучения в высоких дозах (50 Гр и 300 мкг/мл) клеточные культуры A172 и R1 погибали, а в линиях T98G и T2 выявлялись резистентные клетки, которые

характеризовались большим размером, в несколько раз превышающим размер исходных клеток, и имели одно или несколько крупных ядер. Такие клетки оставались живыми, не пролиферировали в течение всего срока наблюдения (1,5–2 мес после воздействия) и были названы переживающими. Основные различия между двумя парами линий глиобластом, по-разному отвечающими на одинаковые генотоксические воздействия, проявлялись, прежде всего, в экспрессии поверхностных маркеров CD56 и CD133/2, которые присутствовали на популяциях клеток A172 и R1 и не выявлялись на клетках T98G и T2. Присутствие маркеров CD56 и CD133/2 связывают с экспрессией генов, опосредующих нейрональную дифференцировку.

По данным научных публикаций клетки глиобластом обладают разными свойствами в зависимости от экспрессии нейральных или мезенхимальных паттернов генов [Gunther H.S. et al., 2008]. Нейрональный маркер CD133 рассматривается, как маркер стволовых клеток в глиобластомах, однако этот маркер не всегда характеризует эту популяцию клеток. Маркером, идентифицирующим стволовые клетки глиобластом, был предложен мезенхимный маркер CD44, эта молекула обеспечивает взаимодействие с компонентами внеклеточного матрикса и придает клеткам глиобластом инвазивные свойства. В современной литературе слабо отражена информация по экспрессии нейронального маркера CD56 на клетках глиобластом. Тем не менее в ряде работ показано, что экспрессия CD56 характерна для клеток глиобластом, обладающих стволовыми свойствами [Balik V. et al., 2009; Soeda A. et al., 2014; Behnan J. et al., 2017].

В результате исследования клеточных линий глиобластом ряд авторов сделали заключение, что существует по крайней мере два типа стволовых клеток, различающихся по пролиферативной активности, фенотипу и экспрессии генов: «нейральные» и «мезенхимальные». Клетки глиобластом, экспрессирующие гены, опосредующие нейрональную дифференцировку, несут маркер CD133, обладают высокой скоростью пролиферации, легче образуют нейросферы и способны к дифференцировке в сторону астроглиальной линии [Gunther H.S. et al., 2008]. Для другого типа была характерна экспрессия генов, связанных с внеклеточным матриксом, низкая экспрессия CD133, такие клетки обладали адгезивностью *in vitro* и слабым онкогенным потенциалом *in vivo*. Для глиобластом со слабой экспрессией CD133 характерна более высокая пролиферативная активность в условиях культивирования с сывороткой, а также способность к дифференцировке в мезенхимальные клеточные типы [Denisenko T. et al., 2014].

Клеточные линии A172 и R1, экспрессировали как CD133/2, так и нейрональный маркер CD56. Эти линии обладали меньшей скоростью пролиферации, чем линии T98G и T2 (Рисунок 7), на которых эти маркеры выявлены не были. Экспрессия CD44 в клеточных линиях выявлялась практически на всех клетках. Можно предположить, что используемые пары линий

глиобластом различались по типу стволовых клеток и экспрессии генов, опосредующих нейрональную дифференцировку.

Воздействие ФМ или облучения на клеточные линии приводило к изменению соотношения клеточных популяций, экспрессирующих маркеры, ассоциированные со стволовым фенотипом. Резистентные клетки в клеточных линиях сохраняли высокую экспрессию мезенхимных маркеров, в том числе CD44, который был экспрессирован на 99% клеток. В линиях A172 и T2 исключение составлял мезенхимный маркер CD90, который исходно был представлен на большинстве клеток этих линий. После действия ФМ в линии A172 отмечалось снижение доли CD90 позитивных клеток в 1,5 раза, в T2 – примерно в 2,5 раза. Увеличение доли CD133/2 позитивных клеток в линии A172 после действия ФМ, по-видимому, связано с экспрессией этого маркера на стволовых клетках, которые характеризуются большей резистентностью к действию как ФМ, так и облучения. В то время, как в линии A172 после действия ФМ (в дозе 50 мкг/мл) было отмечено увеличение содержания клеток, экспрессирующих CD133/2, в линии R1 доля клеток, позитивных по этому маркеру была снижена. По всей видимости, такое изменение популяционного состава связано с исходной гетерогенностью линии R1 и более высокой сублетальной дозой воздействия ФМ (100 мкг/мл). По сравнению с остальными клеточными линиями культура R1 исходно была представлена популяциями клеток, различающимися по экспрессии поверхностных маркеров CD105, CD133/2, CD146, а также белка p53 и репарирующего фермента MGMT. Сокращение популяции CD133/2+ и CD146+ клеток после действия ФМ в линии R1, по-видимому, связана с более высокой чувствительностью этих клеток к действию препарата, чем клеток CD133-CD105+. Таким образом, в результате действия ФМ в линии R1 происходило снижение доли клеток, экспрессирующих нейрональный маркер CD133/2, и увеличение доли клеток, экспрессирующих мезенхимный маркер CD105.

Результаты, полученные в работе D.V Brown и коллег, свидетельствовали о снижении доли клеток, экспрессирующих нейрональный маркер CD133, и увеличении доли клеток, экспрессирующих мезенхимный маркер CD44 после воздействия темозоломида. По мнению авторов, такое изменение экспрессии маркеров в популяциях резистентных клеток является динамическим процессом и имеет много общего с эпителиально-мезенхимальным переходом. Уровни экспрессии маркеров CD44 и CD133 являются уникальными для каждой глиобластомы. D.V. Brown и коллеги отмечали корреляцию маркера CD133 с активной пролиферацией клеток, а CD44 – с инвазивными свойствами клеток глиобластом. Поэтому изменение экспрессии этих маркеров на популяциях резистентных клеток после действия химиотерапии или облучения является важным показателем, который может отражать характер роста опухоли [Brown D.V. et al., 2017].

Переживающие клетки линии T98G, высоко экспрессировали поверхностные маркеры, многие из которых являются полифункциональными молекулами (CD29, CD44, CD73, CD147, CD151). Межклеточные взаимодействия играют важную роль в процессах выживаемости и миграции клеток. Такие маркеры, как CD147 и CD151, связанные с инвазивной способностью и мобильностью клеток, были высоко экспрессированы на как на пролиферирующих, так и переживающих клетках.

В литературных источниках было отмечено, что клетки глиобластом могут секретировать внеклеточные везикулы, которые представляют собой сферические и заключенные в мембрану частицы. Клетки глиобластом через внеклеточные везикулы могут влиять на опухолевые клетки и клетки микроокружения, и тем самым способствовать развитию ангиогенеза, росту и прогрессированию опухоли [Spinelli, C. et al., 2018; Pace K.R. et al., 2019; Whitehead C. A. et al., 2019; Panzarini E. et al., 2020]. В работе C. Spinelli и соавторов было показано, что эндотелиальные клетки поглощали внеклеточные везикулы, секретируемые клетками глиобластом. Активность эндотелиальных клеток увеличивалась после поглощения везикул из клеток пронеурального подтипа глиобластом с низкой экспрессией CD133 и клеток мезенхимального подтипа, не экспрессирующих CD133 [Spinelli, C. et al., 2018]. В недавних исследованиях было отмечено, что клетки глиобластом продуцируют экзосомы с CD147, которые после поглощения астроцитами приводят к увеличению экспрессии MMP-9. Взаимодействие клеток глиобластом с клетками микроокружения может приводить к увеличению инвазивности клеток этих опухолей, а облучение способствовать усилению этого эффекта [Colangelo N.W. et al., 2020]. Возможно, что клетки глиобластом, подобным образом взаимодействуя с клетками микроокружения могут оказывать влияние на прогрессию заболевания.

Одной из проблем резистентности глиобластом является индукция химиопрепаратами и ионизирующим излучением генетических и эпигенетических изменений в клетках. Под влиянием генотоксических факторов в клетках происходит изменение экспрессии ряда генов, связанных с клеточным циклом и репарацией [Bandres E. et al., 2005; Antwi D.A. et al., 2013]. Кроме того, происходит активация сигнальных путей, связанных с выживаемостью. Индукторами этих сигнальных путей служат факторы EGF, FGF2(b), TGFβ1. У пациентов с глиомами высокая активность TGFβ сопряжена с плохим прогнозом. Присутствие этого фактора обеспечивает выживаемость опухолевых клеток и поддерживает онкогенный потенциал стволовых клеток глиобластом [Anido J. et al., 2010]. Действие TGFβ1 приводит к усилению экспрессии белков, связанных с пролиферацией, выживанием, репарацией ДНК, инвазией и миграцией клеток, а также подавлению синтеза белков, ответственных за апоптоз [Брюховецкий, И.С., 2017]. Кроме того, факторы TGFβ1, EGF, HGF являются важными

активаторами ЭМП [Wang X. et al., 2017; Hao Y. et al., 2019; Yin J. et al., 2019]. Известно, что факторы EGF, FGF2(b) влияют на сохранение способности к самоподдержанию популяции стволовых клеток глиобластом [Li G. et al., 2009; Behnan J. et al., 2017]. У пациентов с глиобластомами proneurального подтипа отмечена высокая корреляция между высоким уровнем экспрессии FGF2(b), экспрессией маркера CD44 и сокращением выживаемости [Sooman L. et al., 2015]. Данные исследований показывают, что при рецидивировании глиобластомы могут изменять подтип в сторону мезенхимального. Экспрессия генов, связанных с мезенхимным фенотипом, является неблагоприятным прогностическим признаком. Мезенхимальные свойства придают клеткам глиобластом такие характеристики, как инвазивность и высокая лекарственная устойчивость. В прогрессию глиобластом может быть вовлечен эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – процесс, участвующий в большинстве стадий инвазивно-метастатического каскада. После ЭМП клетки приобретают более высокую мобильность и инвазивные свойства. При развитии ЭМП происходит активация транскрипционных факторов (Snail, Twist, Slug, Zeb) и увеличение экспрессии мезенхимальных маркеров. На развитие ЭМП в глиобластомах оказывают влияние химиопрепараты и ионизирующее излучение. Изучая профиль экспрессии различных ЭМП маркеров в первичных и рецидивирующих глиобластомах, C. Kubelt и соавторами сделали заключение, что в прогрессию глиобластом вовлечен ЭМП, который реализуется индивидуально, проявляясь в изменении экспрессии различных ЭМП-ассоциированных маркеров, поскольку эти опухоли очень гетерогенны [Kubelt C. et al., 2015]. В прогрессию глиобластом вовлечены такие белки внеклеточного матрикса как TNC и THBS1 – основной индуктор TGF β 1. Известно, что увеличение экспрессии белка внеклеточного матрикса TNC связано с активацией процессов формирования тубулярных структур в глиобластомах и способствует развитию ангиогенеза [Cai J. et al., 2019].

Результаты исследования показали, что в линиях A172 и R1 после действия ФМ или облучения в невысоких сублетальных дозах (50 мкг/мл, 36 Гр), отмечалось снижение активности ряда генов. После действия ФМ наиболее выраженное снижение экспрессии было отмечено для генов *TGF β 1*, *EGF* или *TNC*, *HGF* в линиях A172 и R1, а также генов *TNC*, *TGF β 1*, *HGF* после облучения. В то же время, эффект действия ФМ на клетки линий T98G и T2 проявлялся в многократной активации генов проангиогенных и ростовых факторов. По мере увеличения дозы воздействий в линиях T98G и T2 происходило значительное усиление активности ряда генов (*VEGF*, *FGF2(b)*, *EGF* и др.). Этот эффект, вероятнее всего, был связан со сменой клеточных популяций, поскольку именно переживающие клетки, доля которых в линиях T98G и T2 возрастала по мере увеличения дозы воздействия, отличались высоким уровнем синтеза мРНК отмеченных факторов. Сравнение профилей экспрессии генов в клетках

T98G и T2 после действия облучения или ФМ в дозах, приводящих к остановке пролиферативной активности (50 Гр, 300 мкг/мл), показало, что формирующиеся в результате различных генотоксических воздействий клетки характеризовались близким профилем экспрессии генов (Рисунок 19 а, б). Действие как ФМ, так и облучения вызывали одинаковый ответ и направленность изменений экспрессии ряда генов в разных парах клеточных линий. Таким образом, в переживающих клетках отмечалось увеличение экспрессии генов факторов EGF, FGF2(b), TGF β 1, влияющих на выживаемость и поддержание способности к самовоспроизведению стволовых опухолевых клеток.

В переживающих клетках T98G и T2 была отмечена активация генов белков, ассоциированных с мезенхимным фенотипом и внеклеточным матриксом (*FAP*, *TNC*, *THBS1*, α *SMA*), причем в линии T98G это гены, а T2. Также в этих клетках отмечали увеличение экспрессии гена транскрипционного фактора *Zeb1*, одного из ключевых индукторов ЭМП. То есть переживающие клетки активно экспрессировали гены тех факторов, которые связаны с ЭМП и мезенхимным фенотипом. В линиях T98G и T2 максимальная активация была отмечена для генов *FAP*, *TNC*, *HGF*, которые в интактных линиях не обладали высокой активностью. Необходимо отметить, что через месяц после действия ФМ или облучения в популяциях переживающих клеток T98G и T2 были активированы гены тех факторов, активность которых связывают с прогрессией глиобластом.

Многоядерные клетки в том или ином количестве присутствовали в интактных линиях глиобластом, использованных в настоящем исследовании. Присутствие многоядерных клеток в интактных клеточных линиях было различным, такие клетки более часто встречались в линиях T98G и T2. В клеточных линиях T2 и T98G, подвергнутых фракционированному облучению в высоких дозах, многоядерные клетки составляли большую часть популяции. Это может указывать на то, что гигантские резистентные клетки в линиях T2 и T98G образовались в результате действия генотоксических факторов.

Резистентные многоядерные клетки, подобные тем, которые описаны в настоящей работе, привлекают особое внимание в связи с их возможной ролью в прогрессии опухолей [Pienta K.J. et al., 2020; Salem A. et al., 2020; Song, Y. et al., 2021]. Данные публикаций свидетельствуют, что образующиеся в ответ на действие стрессорных и генотоксических факторов гигантские полиплоидные клетки могут генерировать дочерние клетки, экспрессировать маркеры стволовых клеток, и приобретать черты мезенхимного фенотипа [Niu N. et al., 2017; Zhang D. et al., 2017; Amend S.R. et al., 2019; Lin K.C. et al., 2019; Wang X. et al., 2019]. Формированию таких клеток способствует действие различных стрессорных факторов, таких как гипоксия, миметики гипоксии, ионизирующее излучение и химиотерапевтические препараты [Zhang S. et al., 2014; Kaur E. et al., 2015; Niu N. et al., 2017; Fei F. et al., 2019a].

Подобные клетки могут возникать в результате эндорепликации, слияния одноядерных клеток или клеточного «каннибализма» [Chen J. et al., 2019].

Ионизирующее излучение способно вызывать слияние одноядерных клеток глиобластом с образованием многоядерных резистентных клеток. Такие клетки способны выдерживать высокие дозы облучения и характеризуются усилением экспрессии генов, связанных с выживанием, и генов некоторых цитокинов [Kaur E. et al., 2015]. Авторы цитируемой работы подчеркивают, что многоядерные клетки образуются вследствие облучения, а не являются теми многоядерными клетками, которые встречаются в некотором количестве в интактных культурах глиобластом. Слияние опухолевых клеток между собой и нормальными клетками, в том числе стволовыми, в настоящее время рассматривают как один из механизмов выживания опухолевых клеток после действия генотоксических факторов, приводящий к метастазированию и прогрессии опухолей [Dörnen J. et al., 2020; Shabo I. et al., 2020].

Образование полиплоидных клеток во многих случаях связано с нарушениями регуляции клеточного цикла и часто отмечается при мутациях белка p53. «Дикий тип» белка p53 приводит к активации контрольных точек (check point) клеточного цикла, во время остановки которого проходят процессы репарации ДНК, в случае невозможности репарации – к развитию апоптоза. Однако клетки с мутацией p53 часто подвергаются эндорепликации, а не апоптозу. Радиационно-опосредованный механизм образования многоядерности может проявляться у p53 и p21 дефицитных опухолевых клеток. В исследовании R. Mirzayans и коллег, полиплоидные клетки, сформированные в результате действия радиации, аналогично переживающим клеткам T2 и T98G, долгое время оставались жизнеспособны, и в этих клетках отмечался синтез ДНК [Mirzayans R. et al., 2017]. В нашем исследовании переживающие клетки формировались в линии T98G с мутацией белка p53, и не отмечались в A172, характеризующейся наличием белка «дикого типа». В клетках R1 и T2 белок p53 был выявлен иммуноцитохимически, однако использованные антитела не позволили установить, были ли белки мутантными или «дикого типа».

Долгое время считалось, что индуцированная полиплоидия является аналогом клеточной гибели. Однако многочисленные данные свидетельствуют, что полиплоидные клетки могут пребывать некоторое время в состоянии покоя, а затем способны производить пролиферирующее потомство. Полиплоидные клетки могут возвращаться к митотическому делению через процесс деполиплоидизации генома. Гигантские полиплоидные клетки способны генерировать дочерние клетки через асимметричное деление, расщепление и почкование [Niu N. et al., 2016; Niu N. et al., 2017; Zhang D. et al., 2017; Amend S.R. et al., 2019; Wang X. et al., 2019; Wojko A. et al., 2020]. В гигантских клетках, подобных полученным в нашем исследовании клеткам T2 и T98G, отмечалось увеличение экспрессии генов индукторов

ЭМП и маркеров, связанных с мезенхимным фенотипом [Niu N. et al., 2017; Zhang D. et al., 2017]. Кроме того, авторы цитируемых работ показали, что такие полиплоидные клетки были способны генерировать дочерние клетки, которые отличались по геному от исходных опухолевых клеток. Воздействие ионизирующего излучения и химиотерапевтических препаратов может вызывать остановку пролиферации и инициировать в клетках процесс преждевременного старения. Такие клетки могут не пролиферировать, но продуцировать цитокины, ростовые и проангиогенные факторы, взаимодействовать с клетками микроокружения и тем самым способствовать прогрессии заболевания [Bharadwaj D., Mandal M., 2020]. Кроме того, полиплоидные клетки могут способствовать прогрессии опухолей, приводя к развитию неоангиогенеза, такие клетки могут участвовать в процессах формирования васкулогенной мимикрии [Zhang D. et al., 2017].

Клетки T98G и T2, формирующиеся в ответ на действие ФМ и облучения, оставались живыми длительное время и не пролиферировали в течение всего периода наблюдений (1,5–2 мес после воздействия). Однако возникал вопрос, могли ли эти клетки пролиферировать при изменении внешних условий. Известно, что, на процесс выживания и пролиферации может оказывать микроокружение опухолей. Возможно, что изменение определенных внешних условий, воздействие ростовых факторов, взаимодействие с клетками микроокружения, а также с внеклеточным матриксом, может выводить полиплоидные клетки из состояния покоя и инициировать к генерации дочерних клеток, обладающих новыми свойствами.

Таким образом, результаты нашей работы свидетельствуют, что к воздействию облучения и ФМ наибольшей чувствительностью обладали линии, которые экспрессировали маркеры, ассоциированные с «нейральным» типом клеток, в то время как гигантские резистентные клетки формировались в клеточных линиях, исходно не экспрессировавшие эти маркеры, и которые по всей видимости подвергались ЭМП. Сопоставление экспрессии нейрональных маркеров CD56 и CD133 в линиях глиобластом и реакции этих опухолей на действие облучения и химиопрепаратов требует дальнейшего исследования на большем количестве клеточных линий. Нейрональные маркеры CD56 и CD133 могут быть рассмотрены, как потенциальные маркеры прогноза ответа опухоли на действие фотемустина или облучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена проблеме резистентности глиобластом. Мы исследовали новые клеточные линии глиобластом R1 и T2, полученные из опухолей пациентов, и сравнили их с давно используемыми и изученными линиями глиобластом A172 и T98G.

По реакции на действие облучения или ФМ клеточная линия A172 обладала сходством с R1, а линия T98G – с T2. Клеточные линии A172 и R1 были более чувствительны к генотоксическим факторам, чем линии T98G и T2, которые проявили устойчивость к воздействиям за счет формирования крупных одноядерных и многоядерных резистентных клеток, которые не пролиферировали, долгое время сохраняли жизнеспособность (срок наблюдения 1,5 – 2 мес). Основными отличиями между парами линий, по-разному реагирующими на действие одинаковых генотоксических факторов, являлись фенотипические характеристики. В отличие от линий T2 и T98G, в линиях A172 и R1 были отмечены популяции клеток, экспрессирующие маркеры CD56 и CD133/2, что может быть связано с более активной экспрессией в этих клетках генов, опосредующих нейрональную дифференцировку. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о гетерогенности глиобластом и о разной реакции клеточных популяций этих опухолей на одинаковые генотоксические воздействия.

Крупные одноядерные и многоядерные резистентные клетки линий T98G и T2, которые были получены в настоящей работе, представляют большой интерес в связи с их возможной ролью в прогрессии глиобластом. Такие переживающие клетки характеризовались многократным усилением экспрессии ряда генов, связанных с прогрессией опухолей. В клетках было отмечено увеличение активности генов ряда факторов, связанных с выживаемостью клеток и индукцией ЭМП (HGF, EGF и других). В переживающих клетках была отмечена активация гена *FAP*, характерного для клеток мезенхимального происхождения, и гена транскрипционного фактора *Zeb1*. Экспрессию этих факторов связывают с ЭМП. Молекулы внеклеточного матрикса TNC и THBS1, экспрессия генов которых была увеличена в переживающих клетках, также могут участвовать в индукции ЭМП. Таким образом, резистентные переживающие клетки не пролиферировали, но активно экспрессировали гены тех факторов, которые могли бы влиять как на сами опухолевые клетки, так и на их микроокружение.

Полиплоидные клетки, формирующиеся в клеточных линиях других опухолей (опухоли молочной железы, яичников, колоректального рака), подобные тем, которые были описаны в настоящей работе, некоторое время могут пребывать в состоянии покоя, а затем делиться. В нашем исследовании, крупные резистентные клетки не пролиферировали в течение 1,5–2 мес после воздействия, однако вопрос о размножении этих клеток остается открытым.

ВЫВОДЫ

1. Клеточные линии глиобластом A172, T98G, T2 и R1 характеризовались морфологической и фенотипической гетерогенностью. Линии глиобластом A172 и R1, в отличие от линий T98G и T2, содержали популяции клеток, несущих нейрональные маркеры CD56 и CD133/2.

2. Выделено два типа реагирования клеточных линий глиобластом на действие генотоксических факторов. Действие облучения или фотемустина в высоких дозах (50 Гр, 300 мкг/мл) вызывало гибель клеточных культур A172 и R1, в то время как линии T98G и T2 были устойчивы к этим воздействиям за счет появления крупных одноядерных и многоядерных клеток (переживающих клеток), которые сохраняли жизнеспособность в течение всего периода наблюдений (1,5–2 мес после воздействия).

3. Действие облучения или фотемустина в сублетальных дозах (36 Гр, 50 мкг/мл) на линии A172 и R1 приводило к снижению экспрессии ряда генов. Снижение экспрессии было наиболее выражено для генов гепатоцитарного ростового фактора (*HGF*), тенасцина С (*TNC*) и трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ (*TGF\beta 1*).

4. Переживающие клетки линий T98G и T2 характеризовались усилением активности генов ряда факторов, влияющих на прогрессию опухолей. Наиболее выраженное увеличение активности отмечено для генов гепатоцитарного ростового фактора (*HGF*), белка внеклеточного матрикса тенасцина С (*TNC*) и белка активированных фибробластов (*FAP*).

5. Активность генов факторов, влияющих на прогрессию опухолей (тенасцина С (*TNC*), эпидермального ростового фактора (*EGF*), основного фактора роста фибробластов 2 (*FGF2(b)*), фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*)), в переживающих клетках линий T98G и T2 после действия фотемустина в значительной степени совпадала с активностью этих генов после облучения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

A – астроцитарная

Г – глиальная

ДМСО – диметилсульфоксид

НО – не определяли

П – полигональная

ПЖК – переживающие клетки

ПК – пролиферирующие клетки

ПМ – плеоморфизм

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СМ – смешанная

Ф – фибробластоподобная

ФМ – фотемустин

Э – эпителиоидная

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ALCAM – молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов

APC – аллофикоцианин

ATCC – Американский банк клеточных культур (American Type Culture Collection)

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфаты

Col1A1 – $\alpha 1$ цепь коллагена 1 типа

Col1A2 – $\alpha 2$ цепь коллагена 1 типа

Col5A1 – $\alpha 1$ цепь коллагена V типа

DDR – ответ на повреждение ДНК (DNA damage response)

EGF – эпидермальный ростовой фактор

EGFR – рецептор эпидермального ростового фактора

FAK – киназы фокальных контактов

FAP – белок активированных фибробластов

FGF2(b) – основной фактор роста фибробластов 2

FITC – изотиоцианат флуоресцеина

G – амплификация гена

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

HGF – фактор роста гепатоцитов

ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1 типа

ICAM-2 – молекула межклеточной адгезии 2 типа

IDH – изоцитратдегидрогеназа

L1CAM – нейральная молекула клеточной адгезии L1

MMP – матриксная металлопротеиназа

MGMT – O6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза

PE – фикоэритрин

PECAM – молекула клеточной адгезии тромбоцитов и эндотелия

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

SDF-1 – фактор роста стромальных клеток 1

α SMA – гладкомышечный актин α 2

TCGA (The Cancer Genome Atlas) – Атлас ракового генома

TGF β 1 – трансформирующий ростовой фактор β 1

TGF β 3R1 – рецептор трансформирующего ростового фактора β 3 1 типа

TGF β 3R2 – рецептор трансформирующего ростового фактора β 3 2 типа

THBS1 – тромбоспондин-1

TNC – тенасцин C

VCAM-1 – молекула клеточной адгезии сосудистого эндотелия 1 типа

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

WT (wild type) – «дикий тип»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брюховецкий, И. С. Взаимодействие стволовых и опухолевых клеток на модели глиобластомы: специальность 03.03.04 "Клеточная биология, цитология, гистология": автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Брюховецкий Игорь Степанович. – Владивосток, 2017. – 22 с.
2. Иванова, А.Е. Подавление роста клеточных культур глиобластомы при кокультивации с ХАР-НК / А.Е. Иванова, С.П. Чумаков // Вестник современных исследований. – 2020. – № 4-5(34). – С.4-6.
3. Клинические рекомендации. Первичные опухоли центральной нервной системы. [Электронный ресурс]. Общероссийский национальный союз "Ассоциация онкологов России". 2020. URL: https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/pervichnye_opuholi_cns.pdf (Дата обращения 23.12.2021).
4. Колотов, К.А. Иммуногистохимические особенности глиальных опухолей головного мозга / К. А. Колотов, О. В. Машковцев, Б. Н. Бейн // Медицинский альманах. – 2012. – № 4(23). – С.66-69.
5. Кузнецова, Е.В. Получение и анализ двумерных дозовых распределений с помощью радиохромных пленок / Е. В. Кузнецова, Д. Д. Грищук, Т. Е. Понежа // Медицинская физика. – 2012. – №1. – С.27-31.
6. Никитин, П.В. Глиомные стволовые клетки в клеточных кластерах глиобластомы и их влияние на общую выживаемость пациентов // П.В. Никитин, М.В. Рыжова, С.А. Галстян, И.В. Зубова, Е.А. Хохлова // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 6. – С. 105. – DOI: 10.17513/spno.29274 – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29274> (Дата обращения 18.09.2021).
7. Пиневиц, А.А. Характеристика мезенхимальных стромальных клеток при раке молочной железы /А. А. Пиневиц, М. П. Самойлович, О.А. Шашкова, Н. Л. Вартамян, В. Н. Полысалов, Л. Н. Киселева, А. В. Карташев, А. А. Айзенштадт, В. Б. Климович // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – №2. – Р. 84-91.
8. Чернов, А.Н. Методы подбора in vitro химиопрепаратов для индивидуальной химиотерапии злокачественных новообразований пациентов / А. Н. Чернов, Е. П. Баранцевич, В.Н. Калюнов, М.М. Галагудза // Трансляционная медицина. – 2018. – Т.5, №3. – С.40-52.
9. Шамова, Т.В. Получение первичных клеточных линий глиальных опухолей / Т.В. Шамова, А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, Н.С.Кузнецова, С.Э. Кавицкий // Пермский медицинский журнал. – 2020. – Т.37, №5. – С.79-89. – DOI: <https://doi.org/10.17816/pmj37579-89> – URL: <https://permmedjournal.ru/PMJ/article/view/57674> (Дата обращения 23.12.2021).

10. Abad, E. DNA damage response and resistance of cancer stem cells / E. Abad, D. Graifer, A. Lyakhovich // *Cancer Lett.* –2020. –Vol.474. – P.106-117.
11. Addeo, R. Biweekly fotemustine schedule for recurrent glioblastoma in the elderly: activity and toxicity assessment of a multicenter study / R. Addeo, G. Lamberti, G. Simonetti, P. Iodice, A. Marinelli, L. Montella, S. Cappabianca, P. Gaviani, M. Caraglia, S.D. Prete, A. Silvani // *CNS Oncol.* – 2019. – Vol. 8, №2. – P. CNS32. – URL: <https://doi.org/10.2217/cns-2019-0004> (Дата обращения 18.09.2021).
12. Akiyama, Y. Novel cancer-testis antigen expression on glioma cell lines derived from high-grade glioma patients / Y. Akiyama, M. Komiyama, H. Miyata, M. Yagoto, T. Ashizawa, A. Iizuka, C. Oshita, A. Kume, M. Nogami, I. Ito, R. Watanabe, T. Sugino, K. Mitsuya, N. Hayashi, Y. Nakasu, K. Yamaguchi // *Oncol. Rep.* – 2014. – Vol. 31. – P.1683-1690.
13. Amend, S.R. Polyploid giant cancer cells: Unrecognized actuators of tumorigenesis, metastasis, and resistance / S.R. Amend, G. Torga, K.C. Lin, L.G. Kostecka, A. de Marzo, R.H. Austin, K.J. Pienta // *Prostate.* –2019. – Vol.79, №13. – P.1489-1497.
14. Annovazzi, L. Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma / L. Annovazzi, M. Mellai, D. Schiffer // *Cancers (Basel).* –2017. – Vol.9, №6. – P.57. – doi: 10.3390/cancers9060057 – URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/9/6/57> (Дата обращения 15.04.2020).
15. Anido, J. TGF- β receptor inhibitors target the CD44(high)/Id1(high) glioma-initiating cell population in human glioblastoma / J. Anido, A. Sáez-Borderías, A. González-Juncà, L. Rodón, G. Folch, M.A. Carmona, R.M. Prieto-Sánchez, I. Barba, E. Martínez-Sáez, L. Prudkin, I. Cuartas, C. Raventós, F. Martínez-Ricarte, M.A. Poca, D. García-Dorado, M.M. Lahn, J.M. Yingling, J. Rodón, J. Sahuquillo, J. Baselga, J. Seoane // *Cancer Cell.* – 2010. – Vol. 18, №6. – P.655-668.
16. Antwih, D. A. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways / D. A. Antwih, K. M. Gabbara, W. D. Lancaster, D. M. Ruden, S. P. Zielske // *Epigenetics.* – 2013. – Vol. 8, № 8. – P.839-848.
17. Avril, T. CD90 expression controls migration and predicts dasatinib response in glioblastoma / T. Avril, A. Etcheverry, R. Pineau, J. Obacz, G. Jegou, F. Jouan, P.J. Le Reste, M. Hatami, R. R. Colen, B. L. Carlson, P. A. Decker, J. N. Sarkaria, E. Vauléon, D.C. Chiforeanu, A. Clavreul, J. Mosser, E. Chevet, V. Quillien // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 23, № 23. – P.7360-7374.
18. Balik, V. Flow cytometry analysis of neural differentiation markers expression in human glioblastomas may predict their response to chemotherapy / V. Balik, P. Mirossay, P. Bohus, I. Sulla, L. Mirossay, M. Sarissky // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2009. – Vol. 29, №6-7. – P.845-858.

19. Bandres, E. Gene expression profile induced by BCNU in human glioma cell lines with differential MGMT expression / E. Bandres, E. Andion, A. Escalada, B. Honorato, V. Catalan, E. Cubedo, L. Cordeu, F. Garcia, R. Zarate, N. Zabalegui, J. Garcia-Foncillas // *J. Neurooncol.* – 2005. – Vol. 73. – P.189-198.
20. Beauchesne, P. Fotemustine: a third-generation nitrosourea for the treatment of recurrent malignant gliomas / P. Beauchesne // *Cancers.* –2012. – Vol. 4. – P.77-87.
21. Behnan, J. Differential propagation of stroma and cancer stem cells dictates tumorigenesis and multipotency/ J. Behnan, B. Stangeland, S.A. Hosainey, M. Joel, T.K. Olsen, F. Micci, J.C. Glover, P. Isakson, J.E. Brinchmann // *Oncogene.* – 2017. – Vol.36, №4. – P.570-584.
22. Bharadwaj, D. Senescence in polyploid giant cancer cells: A road that leads to chemoresistance / Bharadwaj D., Mandal M. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2020. –Vol.52. –P.68-75.
23. Birch, J.L. Multifaceted transforming growth factor-beta (TGFbeta) signalling in glioblastoma / J.L. Birch, B.J. Coull, L.C. Spender, C. Watt, A. Willison, N. Syed, A.J. Chalmers, M.K. Hossain-Ibrahim, G.J. Inman//*Cell Signal.* – 2020. – Vol.72. – P.109638. – doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109638. – URL: <https://sci-hub.ru/10.1016/j.cellsig.2020.109638> (Версия 26.07.2020).
24. Bigner, D.D. Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas / D. D. Bigner, S. H. Bigner, J. Pontén, B. Westermarck, M. S. Mahaley, E. Ruoslahti, H. Herschman, L. F. Eng, C. J. Wikstrand // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1981. – Vol. 40, №3. –P.201-229.
25. Biroccio, A. Increase of BCNU sensitivity by wt-p53 gene therapy in glioblastoma lines depends on the administration schedule / A. Biroccio, D. D. Bufalo, A. Ricca, C. D'Angelo, G. D'Orazi, A. Sacchi, S. Soddu, G. Zupi // *Gene Ther.* – 1999. – Vol. 6, №6. – P.1064-1072.
26. Bojko, A. Improved Autophagic Flux in Escapers from Doxorubicin-Induced Senescence/Polyploidy of Breast Cancer Cells / Bojko A, Staniak K, Czarnecka-Herok J, Sunderland P, Dudkowska M, Śliwińska MA, Salmina K, Sikora E. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol.21, №17. – P.6084. – doi: 10.3390/ijms21176084 – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6084/html> (Дата обращения 17.01.2022).
27. Brown, D.V. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity / D.V. Brown, G. Filiz, P.M. Daniel, F. Hollande, S. Dworkin, S. Amiridis, N. Kountouri, W. Ng, A.P. Morokoff, T. Mantamadiotis // *PLoS One.* – 2017. – Vol.12, №2. – P. e0172791. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172791> (Дата обращения 18.09.2021).

28. Bryukhovetskiy, I. Transforming growth factor- β mimics the key proteome properties of CD133- differentiated and CD133+ cancer stem cells in glioblastoma / I. Bryukhovetskiy, V. Shevchenko, N. Arnotskaya, T. Kushnir, O. Pak, Z. Victor, S. Zaitsev, Y. Khotimchenko, A. Bryukhovetskiy, A. Sharma, H.S. Sharma // *Int Rev Neurobiol.* –2020. – Vol.151. – P. 219-242. – doi: 10.1016/bs.irn.2020.03.007 – URL: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-85084673064&partnerID=MN8TOARS> (Дата обращения 17.01.2022).
29. Burghardt, I. Endoglin and TGF- β signaling in glioblastoma / I. Burghardt, E. Ventura, T. Weiss, J. J. Schroeder, K. Seystahl, C. Zielasek, D. Gramatzki, M. Weller // *Cell Tissue Res.* –2021. – Vol.384, №3. – P. 613-624. doi: 10.1007/s00441-020-03323-5.
30. Cai, H.P. Tenascin-C mediated vasculogenic mimicry formation via regulation of MMP2/MMP9 in glioma / H. P. Cai, J. Wang, S. Y. Xi, X. R. Ni, Y. S. Chen, Y. J. Yu, Z. W. Cen, Z. H. Yu, F. R. Chen, C. C. Guo, J. Zhang, C. Ke, J. Wang, Z. P. Chen // *Cell Death Dis.* –2019. –Vol.10, №12 –P.879. –doi: 10.1038/s41419-019-2102-3 – URL: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-2102-3> (Дата обращения 18.09.2021).
31. Carusillo, A. DNA Damage: From Threat to Treatment / A. Carusillo, C. Mussolino // *Cells.* –2020. – Vol. 9, №7. – P.1665. – doi: 10.3390/cells9071665. – URL:<https://doi.org/10.3390/cells9071665> (Дата обращения 15.12.2021).
32. Carvalho, L.S. Cancer Stem Cells and Nucleolin as Drivers of Carcinogenesis / L.S. Carvalho, N. Gonçalves, N.A. Fonseca, J.N. Moreira // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2021. – Vol.14, №1. – P.60. – doi: 10.3390/ph14010060. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7828541> (Дата обращения 07.01.2022).
33. Chen, C. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications / C. Chen, S. Zhao, A. Karnad, J.W. Freeman // *J. Hematol. Oncol.* – 2018. –Vol. 11, №1. – P. 64. – doi: 10.1186/s13045-018-0605-5. – URL: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-018-0605-5> (Дата обращения 10.05.2018).
34. Chen, J. Polyploid Giant Cancer Cells (PGCCs): The Evil Roots of Cancer / J. Chen, N. Niu, J. Zhang, L. Qi, W. Shen, K.V. Donkena, Z. Feng, J. Liu // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2019. – Vol.19, №5. – P.360-367.
35. Cheng, F. MET in glioma: signaling pathways and targeted therapies / F. Cheng, D. Guo // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2019. –Vol.38, №1. – P. 270. – doi: 10.1186/s13046-019-1269-x. – URL: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-019-1269-x> (Дата обращения 23.12.2021).
36. Christensen, K. CD133+ niches and single cells in glioblastoma have different phenotypes / K. Christensen, H. D. Schroder, B. W. Kristensen // *J. Neurooncol.* – 2011. – Vol. 104, №1. – P.129-143.

37. Colangelo, N.W. Extracellular vesicles originating from glioblastoma cells increase metalloproteinase release by astrocytes: the role of CD147 (EMMPRIN) and ionizing radiation / N.W. Colangelo, E.I. Azzam // *Cell Commun. Signal.* – 2020. – Vol. 18, № 1. – P.21. – DOI: 10.1186/s12964-019-0494-4 – URL: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-019-0494-4> (Дата обращения 18.09.2021).
38. Cordes, N. β 1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury / N. Cordes, J. Seidler, R. Durzok, H. Geinitz, C. Brakebusch // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25. – P.1378-1390.
39. Daubon, T. Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development // T. Daubon, C. Léon, K. Clarke, L. Andrique, L. Salabert, E. Darbo, R. Pineau, S. Guérit, M. Maitre, S. Dedieu, A. Jeanne, S. Bailly, J.J. Feige, H. Miletic, M. Rossi, L. Bello, F. Falciani, R. Bjerkvig, A. Bikfalvi // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol.10, №1. – P.1146. – doi: 10.1038/s41467-019-08480-y. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-08480-y>. – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21249636> (Дата обращения 23.12.2021).
40. Denysenko, T. Heterogeneous phenotype of human glioblastoma. In vitro study / T. Denysenko, L. Gennero, C. Juenemann, I. Morra, P. Masperi, V. Ceroni, A. Pragliola, A. Ponzetto, A. Melcarne // *Cell Biochem. Funct.* –2014. – Vol. 32. – P. 164-176.
41. Dirkse, A. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment / A. Dirkse, A. Golebiewska, T. Buder, P.V. Nazarov, A. Muller, S. Poovathingal, N.H.C. Brons, S. Leite, N. Sauvageot, D. Sarkisjan, M. Seyfrid, S. Fritah, D. Stieber, A. Michelucci, F. Hertel, C. Herold-Mende, F. Azuaje, A. Skupin, R. Bjerkvig, A. Deutsch, A. Voss-Böhme, S.P. Niclou // *Nat. Commun.* – 2019. – Vol. 10, №1. – P.1787. – doi: 10.1038/s41467-019-09853-z – URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-09853-z> (Дата обращения 23.12.2021).
42. Dong, Q. Elevated CD44 expression predicts poor prognosis in patients with low-grade glioma/ Q. Dong, Q. Li, M. Wang, J. Hu, J. Dai, L. Niu, G. Yuan, Y. Pan // *Oncol. Lett.* – 2019. – Vol. 18, №4. – P.3698-3704.
43. Dongre, A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer // A. Dongre, R.A. Weinberg // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* –2019. – Vol. 20, №2. – P. 69-84.
44. Dörnen, J. Cell fusion of mesenchymal stem/stromal cells and breast cancer cells leads to the formation of hybrid cells exhibiting diverse and individual (stem cell) characteristics / J. Dörnen, O. Myklebost, T. Dittmar // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol.21, №24. – P.9636. – DOI: 10.3390/ijms21249636 – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21249636> (Дата обращения 18.09.2021).

45. Ebert, L.M. Endothelial, pericyte and tumor cell expression in glioblastoma identifies fibroblast activation protein (FAP) as an excellent target for immunotherapy / L.M. Ebert, W. Yu, T. Gargett, J. Toubia, P.M. Kollis, M.N. Tea, B.W. Ebert, C. Bardy, M. van den Hurk, C.S. Bonder, J. Manavis, K.S. Ensbey, M. Oksdath Mansilla, K.G. Scheer, S.L. Perrin, R.J. Ormsby, S. Poonnoose, B. Koszyca, S.M. Pitson, B.W. Day, G.A. Gomez, M.P. Brown // *Clin. Transl. Immunology*. – 2020. – Vol. 9, №10. – P. e1191. – doi: 10.1002/cti2.1191 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cti2.1191> (Дата обращения 23.12.2021).

46. Erfani, S. The Context-Dependent Impact of Integrin-Associated CD151 and Other Tetraspanins on Cancer Development and Progression: A Class of Versatile Mediators of Cellular Function and Signaling, Tumorigenesis and Metastasis / S. Erfani, H. Hua, Y. Pan, B.P. Zhou, X.H. Yang // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol.13, №9. – P.2005. doi: 10.3390/cancers13092005. – URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/9/2005> (Дата обращения 15.12.2021).

47. Fedele, M. Proneural-mesenchymal transition phenotypic plasticity to acquire multitherapy resistance in glioblastoma / Fedele M., Cerchia L., Pegoraro S., Sgarra R., Manfioletti G. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol.20, №11. – P.2746. – DOI: 10.3390/ijms20112746 – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms20112746> (Дата обращения 18.09.2021).

48. Fei, F. Syncytin 1, CD9, and CD47 regulating cell fusion to form PGCCs associated with cAMP/PKA and JNK signaling pathway / F. Fei, C. Li, X. Wang, J. Du, K. Liu, B. Li, P. Yao, Y. Li, S. Zhang // *Cancer Med.* – 2019. – Vol. 8, №6. – P.3047-3058.a

49. Fei, F. The subcellular location of cyclin B1 and CDC25 associated with the formation of polyploid giant cancer cells and their clinicopathological significance / F. Fei, J. Qu, K. Liu, C. Li, X. Wang, Y. Li, S. Zhang // *Lab. Invest.* – 2019. – Vol. 99, №4. – P.483-498.b

50. Fei, F. Formation of Polyploid Giant Cancer Cells Involves in the Prognostic Value of Neoadjuvant Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer / F. Fei, M. Zhang, B. Li, L. Zhao, H. Wang, L. Liu, Y. Li, P. Ding, Y. Gu, X. Zhang, T. Jiang, S. Zhu, S. Zhang // *J. Oncol.* – 2019. – Vol. 2019. – P.2316436.– DOI: 10.1155/2019/2316436 – URL: <https://doi.org/10.1155/2019/2316436> (Дата обращения 18.09.2021).c

51. Ferri, A. Targeting the DNA Damage Response to Overcome Cancer Drug Resistance in Glioblastoma / A. Ferri, V. Stagni, D. Barilà // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, №14. – P.4910. – doi: 10.3390/ijms21144910 – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21144910> (Дата обращения 15.12.2021).

52. Fnu, G. Structural Constraint of Osteopontin Facilitates Efficient Binding to CD44 / G. Fnu, P. Agrawal, G.C. Kundu, G.F. Weber // *Biomolecules*. – 2021. – Vol.11, №6. – P.813. – DOI: 10.3390/biom11060813 – URL: <https://doi.org/10.3390/biom11060813> (Дата обращения 18.09.2021).

53. Giard, D. J. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors / D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, W. P. Parks // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1973. – Vol. 51. – P. 1417-1423.
54. Guardia, G. D. A. Proneural and mesenchymal glioma stem cells display major differences in splicing and lncRNA profiles / G. D. A. Guardia, B. R. Correa, P. R. Araujo, M. Qiao, S. Burns, L. O. F. Penalva, P. A. F. Galante // *Genom Med.* – 2020. – Vol.5. – P.2. –DOI: 10.1038/s41525-019-0108-5 – URL: <https://www.nature.com/articles/s41525-019-0108-5> (Дата обращения 18.09.2021).
55. Gunther, H. S. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria / H. S. Gunther, N. O. Schmidt, H. S. Phillips, D. Kemming, S. Kharbanda, R. Soriano, Z. Modrusan, H. Meissner, M. Westphal, K. Lamszus // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – P. 2897-2909.
56. Guo, Y. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas / Y. Guo, S. Liu, P. Wang, S. Zhao, F. Wang, L. Bing, Y. Zhang, E.A. Ling, J. Gao, A. Hao // *Histopathol.* – 2011. – Vol. 59, №4. – P.763-775.
57. Gussyatiner, O. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options // O. Gussyatiner, M.E. Hegi // *Semin Cancer Biol.* – 2018. – Vol.51. – P.50-58.
58. Han, S. Clinicopathological, prognostic and predictive value of CD166 expression in colorectal cancer: a meta-analysis / S. Han, W. Yang, S. Zong, H. Li, S. Liu, W. Li, Q. Shi, F. Hou // *Oncotarget.* – 2017. – Vol.8, №38. – P.64373-64384.
59. Hao, Y. TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis / Y. Hao, D. Baker, P. Ten Dijke // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol.20, №11. – P.2767. – URL:<https://doi.org/10.3390/ijms20112767> (Дата обращения 18.09.2021).
60. He, J. CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays / J. He, Y. Liu, T. Zhu, J. Zhu, F. DiMeco, A. L. Vescovi, J. A. Heth, K. M. Muraszko, X. Fan, D. M. Lubman // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2012. – Vol.11, №6. – P. M111.010744 – URL: <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010744> (Дата обращения 18.09.2021).
61. Hovinga, K.E. EGFR amplification and classical subtype are associated with a poor response to bevacizumab in recurrent glioblastoma / K.E. Hovinga, H.J. McCrea, C. Brennan, J. Huse, J. Zheng, Y. Esquenazi, K.S. Panageas, V. Tabar // *J. Neurooncol.* – 2019. – Vol.142, №2. – P.337-345.
62. Huang, K. Correlation between FAK and EGF-induced EMT in colorectal cancer cells / K. Huang, N. Gao, D. Bian, Q. Zhai, P. Yang, M. Li, X. J. Wang // *Oncol.* – 2020. – Vol.2020. – P.5428920.
63. Ishii, H. Isolation and characterization of cancer stem cells derived from human glioblastoma/ H. Ishii, Y. Mimura, M.H. Zahra, S. Katayama, G. Hassan, S.M. Afify, M. Seno // *Am. J. Cancer Res.* – 2021. – Vol. 11, №2. – P.441-457.

64. Iwadate, Y. Plasticity in Glioma Stem Cell Phenotype and Its Therapeutic Implication / Y. Iwadate // *Neurol Med Chir (Tokyo)*. – 2018. – Vol.58, №2. – P.61-70.
65. Jayakrishnan C., P. In vitro neurosphere formation correlates with poor survival in glioma / P.C. Jayakrishnan, E.H. Venkat, G.M. Ramachandran, K.K. Kesavapisharady, S.N. Nair, B. Bharathan, N. Radhakrishnan, S. Gopala // *IUBMB Life*. – 2019. – Vol. 71, №2. – P. 244-253.
66. Jayaram, S. Identification of a Novel Splice Variant of Neural Cell Adhesion Molecule in Glioblastoma Through Proteogenomics Analysis / S. Jayaram, L. Balakrishnan, M. Singh, A. Zabihi, R.A. Ganesh, K.K. Mangalaparthi, P. Sonpatki, M.K. Gupta, C.B. Amaresha, K. Prasad, K. Mariswamappa, S. Pillai, A. Lakshmikantha, N. Shah, R. Sirdeshmukh // *OMICS*. – 2018. – Vol. 22, № 6. – P.437-448.
67. Joseph, J. V. TGF- β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion / J. V. Joseph, S. Conroy, T. Tomar, E. Eggens-Meijer, K. Bhat, S. Copray, A. M. Walenkamp, E. Boddeke, V. Balasubramanyian, M. Wagemakers, W. F. den Dunnen, F. A. Kruyt // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol.5, №10. – P. e1443. – DOI: 10.1038/cddis.2014.395 – URL: <https://www.nature.com/articles/cddis2014395> (Дата обращения 18.09.2021).
68. Jimenez-Pascual, A. FGF2: a novel druggable target for glioblastoma / A. Jimenez-Pascual, K. Mitchell, F.A. Siebzehnrbul, J.D. Lathia // *Expert Opin. Ther. Targets*. – 2020. – Vol.24, №4. – P. 311-318. – doi: 10.1080/14728222.2020.1736558 – URL: <https://sci-hub.ru/10.1080/14728222.2020.1736558> (Версия 17.03.2020).
69. Kang, M. K. Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma / M. K. Kang, S. K. Kang // *Stem Cells Dev.* – 2007. – Vol.16. – P. 837-847.
70. Kaur, E. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence / E. Kaur, J. Rajendra, S. Jadhav, E. Shridhar, J. S. Goda, A. Moiyadi, S. Dutt // *Carcinogenesis*. – 2015. – Vol.36. – P.685-695.
71. Kipper, F. C. Vinblastine and antihelminthic mebendazole potentiate temozolomide in resistant gliomas / F. C. Kipper, A. O. Silva, A. L. Marc, G. Confortin, A. V. Junqueira, E. P. Neto, G. Lenz // *Invest. New Drugs*. – 2018. – Vol.36, №2. – P.323-331.
72. Kubelt, C. Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas / C. Kubelt, K. Hattermann, S. Sebens, H. M. Mehdorn, J. Held-Feindt // *Int. J. Oncol.* – 2015. – Vol.46, №6. – P.2515-2525.
73. Lavelle, C. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology / C. Lavelle, N. Foray // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 49. – P. 84-97.

74. von Lersner, A. Modulation of cell adhesion and migration through regulation of the immunoglobulin superfamily member ALCAM/CD166 // A. von Lersner, L. Drogen, A. Zijlstra // Clin. Exp. Metastasis. – 2019. – Vol.36, №2. – P.87-95.
75. Li, G. Autocrine factors sustain glioblastoma stem cell self-renewal / G. Li, Z. Chen, Y. D. Hu, H. Wei, D. Li, H. Ji, D. L. Wang // Oncol. Rep. – 2009. – Vol. 21, №2 – P.419-424.
76. Li, H. CD147 and glioma: a meta-analysis / H. Li, Z. Xi, X. Dai, W. Wu, Y. Li, Y. Liu, H. Zhang // J. Neurooncol. – 2017. – Vol.134, №1. – P.145-156.
77. Li, J. NCAM regulates the proliferation, apoptosis, autophagy, EMT, and migration of human melanoma cells via the Src/Akt/mTOR/cofilin signaling pathway / J. Li, R. Yang, H. Yang, S. Chen, L. Wang, M. Li, S. Yang, Z. Feng, J. Bi // J. Cell Biochem. – 2020. – Vol.121, №2. – P.1192-1204.
78. Lin, J. C. MSI1 associates glioblastoma radioresistance via homologous recombination repair, tumor invasion and cancer stem-like cell properties / J. C. Lin, J. T. Tsai, T. Y. Chao, H. I. Ma, C. S. Chien, W. H. Liu // Radiother. Oncol. – 2018. – Vol. 129, №2. – P.352-363.
79. Lin, K.C. The role of heterogeneous environment and docetaxel gradient in the emergence of polyploid, mesenchymal and resistant prostate cancer cells / K.C. Lin, G. Torga, Y. Sun, R. Axelrod, K.J. Pienta, J.C. Sturm, R.H. Austin // Clin. Exp. Metastasis. – 2019. – Vol. 36, №2. – P.97-108.
80. Liu, K. Different p53 genotypes regulating different phosphorylation sites and subcellular location of CDC25C associated with the formation of polyploid giant cancer cells / K. Liu, M. Zheng, Q. Zhao, K. Zhang, Z. Li, F. Fu, H. Zhang, J. Du, Y. Li, S. Zhang // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2020. – Vol.39, №1. – P.83. – doi: 10.1186/s13046-020-01588-w – URL: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-020-01588-w> (Дата обращения 18.09.2021).
81. Liu, W.H. CD44-associated radioresistance of glioblastoma in irradiated brain areas with optimal tumor coverage / W. H. Liu, J. C. Lin, Y. C. Chou, M. H. Li, J. T. Tsai // Cancer Med. – 2020. – Vol.9, №1. – P.350-360.
82. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. –2001. – Vol. 25. – P. 402-408.
83. Louis, D. N. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary / D. N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, D. W. Ellison // Acta Neuropathol. – 2016. – Vol.131, №6. – P.803-820.
84. Ludlum, D. B. The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level / D. B. Ludlum // Cancer Invest. – 1997. – Vol.15, №6. – P.588-598.

85. Mahabir, R. Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma / R. Mahabir, M. Tanino, A. Elmansuri, L. Wang, T. Kimura, T. Itoh, Y. Ohba, H. Nishihara, H. Shirato, M. Tsuda, S. Tanaka // *Neuro Oncol.* – 2014. – Vol.16, №5. – P.671-685.

86. Marinelli, A. High-dose fotemustine in temozolomide-pretreated glioblastoma multiforme patients: A phase I/II trial. Marinelli A, Lamberti G, Cerbone L, Cordua N, Buonerba C, Peluso G, Di Lorenzo G, De Placido S. *Medicine (Baltimore).* – 2018. – Vol.97, №27. – P. e11254. – doi: 10.1097/MD.00000000000011254. – URL: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2018/07060/High_dose_fotemustine_in_temozolomide_pretreated.17.aspx (Дата обращения 15.12.2021).

87. Mei, X. Glioblastoma stem cell differentiation into endothelial cells evidenced through live-cell imaging // X. Mei, Y.S. Chen, F.R. Chen, S.Y. Xi, Z.P. Chen // *Neuro Oncol.* –2017. –Vol. 19, №8. –P.1109-1118.

88. Melendez, B. Copy number alterations in glioma cell lines. In: Glioma. Exploring its biology and practical relevance / B. Melendez, A. Garcia-Claver, Y. Ruano, Y. Campos-Martin, A. R. de Lope, E. Perez-Magan, P. Mur, S. Torres, M. Lorente, G. Velasco, M. Mollejo // Rijeka: InTech. – 2011. – P.429-448.

89. McCutcheon, I.E. Historical Perspective on Surgery and Survival with Glioblastoma: How Far Have We Come? / I.E. McCutcheon, M.C. Preul // *World Neurosurg.* – 2021. – Vol. 149. P. 148-168.

90. Mihic, J. Prognostic role of CD44 expression and neovascularization determined by endoglin (CD105) in glioblastoma patients // J. Mihić, K. Rotim, M. Vučić, I. Hude Dragičević, M. Borić, L. Lugović-Mihić // *Acta Clin Croat.* – 2019. – Vol.58, №3. – P.455-462.

91. Minata, M. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation / M. Minata, A. Audia, J. Shi, S. Lu, J. Bernstock, M.S. Pavlyukov, A. Das, S.H. Kim, Y.J. Shin, Y. Lee, H. Koo, K. Snigdha, I. Waghmare, X. Guo, A. Mohyeldin, D. Gallego-Perez, J. Wang, D. Chen, P. Cheng, F. Mukheef, M. Contreras, J.F. Reyes, B. Vaillant, E.P. Sulman, S.Y. Cheng, J.M. Markert, B.A. Tannous, X. Lu, M. Kango-Singh, L.J. Lee, D.H. Nam, I. Nakano, K.P. Bhat // *Cell Rep.* – 2019. – Vol. 26, №7. – P. 1893-1905.e7. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.076> (Дата обращения 18.09.2021).

92. Mirzayans, R. Multinucleated giant cancer cells produced in response to ionizing radiation retain viability and replicate their genome / R. Mirzayans, B. Andrais, A. Scott, Y. W. Wang, P. Kumar, D. Murray // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol.18. – P.360. – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms18020360> (Дата обращения 18.09.2021).

93. Mirzayans, R. Viability Assessment Following Anticancer Treatment Requires Single-Cell Visualization / R. Mirzayans, B. Andraiss, D. Murray // *Cancers (Basel)*. – 2018. – Vol.10, № 8. – P. 255. – URL: <https://doi.org/10.3390/cancers10080255> (Дата обращения 18.09.2021).
94. Mirzayans, R. Intratumor Heterogeneity and Therapy Resistance: Contributions of Dormancy, Apoptosis Reversal (Anastasis) and Cell Fusion to Disease Recurrence / R. Mirzayans, D. Murray // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, №4. – P.1308. – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21041308> (Дата обращения 18.09.2021).
95. Mittal, K. Multinucleated polyploidy drives resistance to Docetaxel chemotherapy in prostate cancer // K. Mittal, S. Donthamsetty, R. Kaur, C. Yang, M.V. Gupta, M.D. Reid, D.H. Choi, P.C.G. Rida, R. Aneja // *Br. J. Cancer*. – 2017. – Vol.116, №9. – P.1186-1194.
96. Mulcahy, E.Q.X. HGF/MET Signaling in Malignant Brain Tumors / E.Q.X Mulcahy, R.R. Colón, R. Abounader // *Int.J.Mol.Sci.* – 2020. – Vol.21, №20. – P. 7546. – doi: 10.3390/ijms21207546. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/20/7546/html> (Дата обращения 23.12.2021).
97. Nikolova, T. Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling / T. Nikolova, W.P. Roos, O.H. Krämer, H.M. Strik, B. Kaina // *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer*. – 2017. – Vol. 1868, № 1. – P.29-39.
98. Nishikawa, M. Hypoxia-induced phenotypic transition from highly invasive to less invasive tumors in glioma stem-like cells: Significance of CD44 and osteopontin as therapeutic targets in glioblastoma / M. Nishikawa, A. Inoue, T. Ohnishi, H. Yano, S. Ozaki, Y. Kanemura, S. Suehiro, Y. Ohtsuka, S. Kohno, S. Ohue, S. Shigekawa, H. Watanabe, R. Kitazawa, J. Tanaka, T. Kunieda // *Transl. Oncol.* – 2021. – Vol. 14, №8. – P.101137. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101137> (Дата обращения 18.09.2021).
99. Niu, N. Linking genomic reorganization to tumor initiation via the giant cell cycle / N. Niu, J. Zhang, N. Zhang, I. Mercado-Urbe, F. Tao, Z. Han, S. Pathak, A. S. Multani, J. Kuang, J. Yao, R. C. Bast, A. K. Sood, M.-C. Huang, J. Liu // *Oncogenesis*. – 2016. – Vol.5, №12. – P. e281. – DOI: 10.1038/oncsis.2016.75 – URL: <https://www.nature.com/articles/oncsis201675> (Дата обращения 18.09.2021).
100. Niu, N. Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells / N. Niu, I. Mercado-Urbe, J. Liu // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36. – P.4887-4900.
101. Ouhtit, A. CD146, a novel target of CD44-signaling, suppresses breast tumor cell invasion / A. Ouhtit, M.E. Abdraboh, A.D. Hollenbach, H. Zayed, M.H.G. Raj // *Cell Commun. Signal.* – 2017. – Vol.15, №1. – P.45. – doi: 10.1186/s12964-017-0200-3. – URL: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-017-0200-3> (Дата обращения 18.09.2021).

102. Ouhtit, A. Novel CD44-downstream signaling pathways mediating breast tumor invasion / A. Ouhtit, B. Rizeq, H.A. Saleh, M.M. Rahman, H. Zayed // *Int. J. Biol. Sci.* – 2018. – Vol.14, №13. – P.1782-1790. – doi: 10.7150/ijbs.23586. – <https://www.ijbs.com/v14p1782.htm> (Дата обращения 18.09.2021).
103. Pace, K.R. Exosomal L1CAM Stimulates Glioblastoma Cell Motility, Proliferation, and Invasiveness / K.R. Pace, R. Dutt, D.S. Galileo // *Int. J. Mol. Sci.* –2019. – Vol. 20, №16. – P. 3982. – doi: 10.3390/ijms20163982. – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms20163982> (Дата обращения 23.12.2021).
104. Panzarini, E. Molecular Characterization of Temozolomide-Treated and Non Temozolomide-Treated Glioblastoma Cells Released Extracellular Vesicles and Their Role in the Macrophage Response /Panzarini E, Tacconi S, Carata E, Mariano S, Tata AM, Dini L.// *Int. J. Mol. Sci.* –2020. –Vol. 21, №21. – P. 8353. – doi: 10.3390/ijms21218353. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8353> (Дата обращения 23.12.2021).
105. Pienta, K.J. Poly-aneuploid cancer cells promote evolvability, generating lethal cancer / K.J. Pienta, E.U. Hammarlund, R. Axelrod, J.S. Brown, S.R. Amend // *Evol. Appl.* –2020. – Vol.13, №7. –P.1626-1634.
106. Peñuelas, S. TGF- β increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma / S. Peñuelas, J. Anido, R. M. Prieto-Sánchez, G. Folch, I. Barba, I. Cuartas, D. García-Dorado, M. A. Poca, J. Sahuquillo, J. Baselga, J. Seoane // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol.15, №4. – P.315-327.
107. Phillips, H. S. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis / H. S. Phillips, S. Kharbanda, R. Chen, W. F. Forrest, R. H. Soriano, T. D. Wu, A. Misra, J. M. Nigro, H. Colman, L. Soroceanu, P.M. Williams, Z. Modrusan, B. G. Feuerstein, K. Aldape // *Cancer Cell.* – 2006. –Vol. 9, № 3. – P.157-173.
108. Pietrobono, D. High Adenosine Extracellular Levels Induce Glioblastoma Aggressive Traits Modulating the Mesenchymal Stromal Cell Secretome / D. Pietrobono, C. Giacomelli, L. Marchetti, C. Martini, M.L. Trincavelli // *Int.J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol.21, №.20. – P. 7706. – doi: 10.3390/ijms21207706. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8353> (Дата обращения 23.12.2021).
109. Pontén, J. Long term culture of normal and neoplastic human glia / J. Pontén, E. H. Macintyre // *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* – 1968. – Vol.74, №4. –P.465-486.
110. Puck, T. T. Action of X-rays on mammalian cells / T. T. Puck, P. I. Marcus // *J. Exp. Med.* – 1956. – Vol. 103. – P.653-666.

111. Qi, C. Thrombospondin-1 is a prognostic biomarker and is correlated with tumor immune microenvironment in glioblastoma / C. Qi, L. Lei, J. Hu, G. Wang, J. Liu, S. Ou // *Oncol. Lett.* – 2021. – Vol.21, №1. – P.22. – doi: 10.3892/ol.2020.12283. – URL: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2020.12283> (Дата обращения 23.12.2021).
112. Restrepo, A. Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas / A. Restrepo, C.A. Smith, S. Agnihotri, M. Shekarforoush, P.N. Kongkham, H. J. Seol, P. Northcott, J. T. Rutka // *Neuro Oncol.* – 2011. – Vol.13. – P.42-50.
113. Roos, W. P. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine / W.P. Roos, L. F. Batista, S. C. Naumann, W. Wick, M. Weller, C. F. Menck, B. Kaina // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26, №2. – P.186-197.
114. Salem, A. Are polyploid giant cancer cells in high grade serous carcinoma of the ovary blastomere-like cancer stem cells / A. Salem, K. Pinto, M. Koch, J. Liu, E.G. Silva // *Ann. Diagn. Pathol.* – 2020. – Vol.46: – P.151505. – doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151505. – URL: <https://sci-hub.ru/10.1016/j.anndiagpath.2020.151505> (Версия 17.05.2020).
115. Senbanjo, L.T. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells / L.T. Senbanjo, M.A..Chellaiah // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2017. – Vol.5. – P.18. – URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018> (Дата обращения 18.09.2021).
116. Shabo, I. Roles of cell fusion, hybridization and polyploid cell formation in cancer metastasis / I. Shabo, J. Svanvik, A. Lindström, T. Lechertier, S. Trabulo, J. Hulit, T. Sparey, J. Pawelek, J. World // *Clin. Oncol.* –2020. – Vol.11, №3. – P.121-135.
117. Shen, L. EphA2, vascular endothelial growth factor, and vascular endothelial growth factor correlate with adverse outcomes and poor survival in patients with glioma / L. Shen, R. Sun, S. Kan, Z. Wang, Z. Yu // *Medicine (Baltimore).* – 2021. – Vol.100, №3. – P. e23985. – doi: 10.1097/MD.00000000000023985. – URL: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2021/01220/EphA2,_vascular_endothelial_growth_factor,_and.67.aspx (Дата обращения 22.12.2021).
118. Shimura, T. Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells / T. Shimura, N. Noma, T. Oikawa, Y. Ochiai, S. Kakuda, Y. Kuwahara, Y. Takai, A. Takahashi, M. Fukumoto // *Oncogenesis.* – 2012. – Vol.1, №6. – P. e12. – <https://www.nature.com/articles/oncsis201212> (Дата обращения 18.09.2021).
119. Shu, Z. Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly / Z. Shu, S. Row, W.M. Deng // *Trends Cell Biol.* – 2018. – Vol. 28, №6. – P.465-474.
120. Si, D. High Expression of CD44 Predicts a Poor Prognosis in Glioblastomas / D. Si, F. Yin, J. Peng, G. Zhang // *Cancer Manag. Res.* – 2020. – Vol.12. – P.769-775.

121. Singh, S. K. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors / S. K. Singh, I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, P. B. Dirks // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P.5821-5828.
122. Skandalis, S.S. Hyaluronan-CD44 axis orchestrates cancer stem cell functions // S.S. Skandalis, T.T. Karalis, A. Chatzopoulos, N.K. Karamanos // *Cell Signal.* – 2019. – Vol. 63. – P. 109377. – doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109377 – URL: <https://sci-hub.ru/10.1016/j.cellsig.2019.109377> (Дата обращения 21.11.2019).
123. Soeda, A. Surface Protein Dynamics in Glioma Stem Cells / A. Soeda, N. Ohe, D. Lee, T. Iwama, D.M. Park // *Austin Neurosurg Open Access.* – 2014. – Vol.1, №3. – P. 1015. – URL : <https://austinpublishinggroup.com/neurosurgery/fulltext/ajns-v1-id1015.php> (Дата обращения 18.09.2021).
124. Song, Y. Stress-Induced Polyploid Giant Cancer Cells: Unique Way of Formation and Non-Negligible Characteristics / Y. Song, Y. Zhao, Z. Deng, R. Zhao, Q. Huang // *Front. Oncol.* – 2021. – Vol. 11. – P.724781. – doi: 10.3389/fonc.2021.724781. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.724781/full> (Дата обращения 12.01.2022).
125. Sooman, L. FGF2 as a potential prognostic biomarker for proneural glioma patients / L. Sooman, E. Freyhult, A. Jaiswal, S. Navani, P. H. Edqvist, F. Pontén, E. Tchougounova, A. Smits, T. Elsir, J. Gullbo, J. Lennartsson, M. Bergqvist, S. Ekman // *Acta Oncol.* – 2015. – Vol.54, №3. – P.385-394.
126. Spinelli, C. Molecular subtypes and differentiation programmes of glioma stem cells as determinants of extracellular vesicle profiles and endothelial cell-stimulating activities / C. Spinelli, L. Montermini, B. Meehan, A.R. Brisson, S. Tan, D. Choi, I. Nakano, J. Rak // *J. Extracell. Vesicles.* – 2018. – Vol.7, №1. – P.1490144. – doi: 10.1080/20013078.2018.1490144. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2018.1490144> (Дата обращения 23.12.2021).
127. Stein, G.H. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro / G. H. Stein // *J. Cell Physiol.* – 1979. – Vol. 99. – P.43-54.
128. Tilghman, J. Regulation of Glioblastoma Tumor-Propagating Cells by the Integrin Partner Tetraspanin CD151 / J. Tilghman, P. Schiapparelli, B. Lal, M. Ying, A. Quinones-Hinojosa, S. Xia, / *Lattera J. Neoplasia.* – 2016. – Vol.18, №3. – P.185-198.
129. Tsai, M.H. Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation / M. H. Tsai, J. A. Cook, G. V. Chandramouli, W. De Graff, H. Yan, S. Zhao, C. N. Coleman, J. B. Mitchell, E. Y. Chuang // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 8. – P.3845-3852.

130. Tsiampali, J. Enzymatic Activity of CD73 Modulates Invasion of Gliomas via Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Reprogramming /Tsiampali J, Neumann S, Giesen B, Koch K, Maciarczyk D, Janiak C, Hänggi D, J. Maciarczyk // Pharmaceuticals (Basel). – 2020. –Vol.13, №11. – P. 378. – doi: 10.3390/ph13110378. – URL: <https://www.mdpi.com/1424-8247/13/11/378> (Дата обращения 23.12.2021).

131. Verhaak, R.G. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 / R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, D. N. Hayes; Cancer Genome Atlas Research Network // Cancer Cell. – 2010. – Vol. 17. – P.98-110.

132. Vidal, A.C. Soluble endoglin (sCD105) as a novel biomarker for detecting aggressive prostate cancer / A. C. Vidal, F. Duong, L. E. Howard, E. Wiggins, S. J. Freedland, N. A. Bhowmick, J. Gong // Anticancer Res. – 2020. – Vol. 40, № 3. – P.1459-1462.

133. Wang, H.H. GADD45A plays a protective role against temozolomide treatment in glioblastoma cells / H. H. Wang, T. Y. Chang, W. C. Lin, K. C. Wei, J. W. Shin // Sci. Rep. – 2017. – Vol.7, №1. – P.8814. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-06851-3> (Дата обращения 18.09.2021).a

134. Wang, H. H. Whether CD44 is an applicable marker for glioma stem cells // H.H. Wang, C.C. Liao, N.H. Chow, L.L. Huang, J.I. Chuang, K.C. Wei, J.W. Shin // Am. J. Transl. Res. –2017. – Vol.9, №11. – P. 4785-4806.b

135. Wang, L. The Role of CD44 and Cancer Stem Cells / L. Wang, X. Zuo, K. Xie, D. Wei // Methods Mol. Biol. – 2018. – Vol. 1692. – P. 31-42.

136. Wang, X. The critical role of EGF- β -catenin signaling in the epithelial-mesenchymal transition in human glioblastoma / X. Wang, S. Wang, X. Li, S. Jin, F. Xiong, X. Wang // Onco. Targets. Ther. – 2017. – Vol.10. – P.2781-2789.

137. Wang, X. EMT-related protein expression in polyploid giant cancer cells and their daughter cells with different passages after triptolide treatment / X. Wang, M. Zheng, F. Fei, C. Li, J. Du, K. Liu, Y. Li, S. Zhang // Med. Oncol. – 2019. – Vol. 36, №9. – P.82. – DOI: 10.1007/s12032-019-1303-z – URL: <https://sci-hub.ru/10.1007/s12032-019-1303-z> (Версия 15.08.2019).

138. Weng, C.H. Cisplatin-Induced Giant Cells Formation Is Involved in Chemoresistance of Melanoma Cells / C.H. Weng, C.S. Wu, J.C. Wu, M.L. Kung, M.H. Wu, M.H. Tai // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol.21, №21. – P. 7892.

139. Whitehead, C.A. Extracellular vesicles and their role in glioblastoma / C.A. Whitehead, A.H. Kaye, K.J. Drummond, S.S. Widodo, T. Mantamadiotis, L.J. Vella, S.S. Stylli // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2019. – Vol. 22. – P.1-26.
140. White-Gilbertson, S. Genetic and pharmacological inhibition of acid ceramidase prevents asymmetric cell division by neosis / S. White-Gilbertson, P. Lu, J.S. Norris, C. Voelkel-Johnson // *J. Lipid Res.* – 2019. – Vol. 60, №7. – P. 1225-1235.
141. White-Gilbertson, S. Tamoxifen is a candidate first-in-class inhibitor of acid ceramidase that reduces amitotic division in polyploid giant cancer cells – Unrecognized players in tumorigenesis / S. White-Gilbertson, P. Lu, C.M. Jones, S. Chiodini, D. Hurley, A. Das, J.R. Delaney, J.S. Norris, C. Voelkel-Johnson // *Cancer Med.* – 2020. – Vol.9, №9. – P.3142-3152.
142. Wu, G. Expression of CD44 and the survival in glioma: a meta-analysis / G. Wu, X. Song, J. Liu, S. Li, W. Gao, M. Qiu, C. Yang, Y. Ma, Y. Chen // *Biosci. Rep.* – 2020. – Vol.40, №4. – P. BSR20200520. – URL: <https://doi.org/10.1042/BSR20200520> (Дата обращения 18.09.2021).
143. Yan, A. CD73 Promotes Glioblastoma Pathogenesis and Enhances Its Chemoresistance via A(2B) Adenosine Receptor Signaling / A. Yan, M.L. Joachims, L.F. Thompson, A.D. Miller, P.D. Canoll, M.S. Bynoe // *J. Neurosci.* – 2019. – Vol. 39, №22. – P.4387-4402.
144. Yawata, T. CD146 is highly expressed in glioma stem cells and acts as a cell cycle regulator / T. Yawata, Y. Higashi, Y. Kawanishi, T. Nakajo, N. Fukui, H. Fukuda, T. Ueba // *J. Neurooncol.* – 2019. – Vol. 144, № 1. – P.21-32.
145. Yin, J. HGF/MET regulated epithelial-mesenchymal transitions and metastasis by FOSL2 in non-small cell lung cancer / J. Yin, W. Hu, W. Fu, L. Dai, Z. Jiang, S. Zhong, B. Deng, J. Zhao // *Onco. Targets Ther.* – 2019. – Vol.12. – P.9227-9237.
146. Yoneura, N. Expression of annexin II and stromal tenascin C promotes epithelial to mesenchymal transition and correlates with distant metastasis in pancreatic cancer / N. Yoneura, S. Takano, H. Yoshitomi, Y. Nakata, R. Shimazaki, S. Kagawa, K. Furukawa, T. Takayashiki, S. Kuboki, M. Miyazaki, M. Ohtsuka // *Int. J. Mol. Med.* – 2018. – Vol.42, №2. – P. 821-830.
147. Zhang, J.F. IL-33/ST2 axis promotes glioblastoma cell invasion by accumulating tenascin-C / J.F. Zhang, T. Tao, K. Wang, G.X. Zhang, Y. Yan, H.R. Lin, Y. Li, M.W. Guan, J.J. Yu, X.D. Wang // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, №1. – P.20276. – doi: 10.1038/s41598-019-56696-1. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-56696-1> (Дата обращения 23.12.2021).
148. Zhang, S. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploidy giant cells / S. Zhang, I. Mercado-Urbe, Z. Xing, B. Sun, J. Kuang, J. Liu // *Oncogene.* – 2014. – Vol.33. – P.116-128.

149. Zhang, S. Tumor budding, micropapillary pattern, and polyploidy giant cancer cells in colorectal cancer: current status and future prospects / S. Zhang, D. Zhang, Z. Yang, X. Zhang // Stem Cells Int. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4810734.

150. Zhang, Z. Irradiation-induced polyploid giant cancer cells are involved in tumor cell repopulation via neosis // Z. Zhang, X. Feng, Z. Deng, J. Cheng, Y. Wang, M. Zhao, Y. Zhao, S. He, Q. Huang // Mol. Oncol. – 2021. – Vol.15, №8. – P. 2219-2234.

151. Zeng, F. Regulating glioma stem cells by hypoxia through the Notch1 and Oct3/4 signaling pathway / F. Zeng, H. Chen, Z. Zhang, T. Yao, G. Wang, Q. Zeng, S. Duan, Y. Zhan // Oncol. Lett. – 2018. – Vol.16, №5. – P.6315-6322.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 — Относительный уровень экспрессии генов в клеточных линиях глиобластом

Ген	ΔCT							
	A172		T98G		R1		T2	
	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ
<i>TGFβ1</i>	8,33	0,37	8,81	0,25	5,2	0,7	7,52	0,26
<i>VEGF</i>	4,94	0,03	6,66	0,06	6,21	0,51	8,79	0,31
<i>FGF2(b)</i>	5,68	0,1	7,53	0,1	8,09	0,06	6,7	0,4
<i>EGF</i>	11,68	0,2	14,04	0,22	11,77	0,41	12,92	0,38
<i>HGF</i>	14,26	0,69	>20,0	0	8,88	0,03	13,17	0,17
<i>αSMA</i>	6,27	0,07	7,48	0,05	7,88	0,44	7,84	0,3
<i>FAP</i>	8,5	0,32	17,2	0,52	9,46	0,28	15,41	0,42
<i>THBS1</i>	6,65	0,23	8,21	0,14	4,61	0,5	3,89	0,61
<i>TNC</i>	6,17	0,06	16,13	0,33	6,47	0,93	9,39	0,25

Примечание. Уровень экспрессии генов представлен в виде разницы (ΔCT) между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH*. CT – пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции. m – Среднее арифметическое, σ – стандартное отклонение.

Таблица 2 — Изменение экспрессии генов в клетках линий глиобластом A172 и R1 после воздействия ФМ в дозе 50 мкг/мл

Ген	$2^{-\Delta\Delta CT}$					
	A172			R1		
	m	Me	σ	m	Me	σ
<i>TGFβ1</i>	0,21*	0,21 [0,13–0,28]	0,08	0,4	0,4 [0,36–0,44]	0,06
<i>VEGF</i>	0,17*	0,17 [0,14–0,19]	0,03	0,55	0,55 [0,5–0,63]	0,07
<i>FGF(b)</i>	0,61	0,61 [0,59–0,62]	0,02	0,86	0,86 [0,77–0,95]	0,13
<i>EGF</i>	0,22*	0,22 [0,19–0,25]	0,03	0,42*	0,42 [0,33–0,51]	0,13
<i>HGF</i>	0,92	0,92 [0,74–1,09]	0,18	0,25*	0,25 [0,22–0,27]	0,04
<i>αSMA</i>	0,65	0,65 [0,46–0,84]	0,19	0,62	0,62 [0,46–0,8]	0,15
<i>FAP</i>	0,25*	0,25 [0,14–0,36]	0,11	0,68	0,68 [0,61–0,74]	0,09
<i>THBS1</i>	0,31*	0,31 [0,14–0,47]	0,23	0,97	0,98 [0,92–1,01]	0,05
<i>TNC</i>	0,36*	0,36 [0,46–0,26]	0,1	0,65	0,65 [0,6–0,7]	0,07
<i>Zeb1</i>	0,35*	0,35 [0,32–0,36]	0,03	0,6	0,6 [0,59–0,6]	0,01

Таблица 3 — Изменение экспрессии генов в клетках линий глиобластом T98G и T2 после воздействия ФМ в дозе 100 мкг/мл

Ген	$2^{-\Delta\Delta CT}$					
	T98G			T2		
	m	Me	σ	m	Me	σ
<i>TGFβ1</i>	1,29	1,29 [1,26–1,32]	0,03	1,03	1,03 [1,01–1,04]	0,02
<i>VEGF</i>	1,3	1,3 [1,19–1,4]	0,11	3,27*	3,27 [3,12–3,41]	0,21
<i>FGF(b)</i>	3,03*	3,03 [2,95–3,1]	0,08	1,14	1,14 [1,02–1,25]	0,16
<i>EGF</i>	1,26	1,26 [1,23–1,29]	0,03	1,49	1,49 [1,45–1,51]	0,05
<i>HGF</i>	6,54*	6,54 [5,19–7,89]	1,35	1,35	1,35 [1,31–1,38]	0,05
<i>αSMA</i>	1,38	1,38 [1,31–1,45]	0,09	1,16	1,08 [1,06–1,24]	0,1
<i>FAP</i>	14,41*	14,41 [10,56–8,25]	3,83	3,45*	3,45 [2,09–5,74]	1,99
<i>THBS1</i>	6,15*	6,15 [5,94–6,36]	0,21	1,12	1,12 [1,0–1,24]	0,12
<i>TNC</i>	35,86*	35,86 [33,13–8,59]	2,73	10,81*	10,81 [9,71–11,88]	1,53
<i>Zeb1</i>	2,65*	2,65 [2,16–3,14]	0,49	1,72	1,72 [1,65–1,8]	0,08

Таблица 4 — Изменение экспрессии генов в клетках линий глиобластом T98G и T2 после воздействия ФМ в дозе 300 мкг/мл

Ген	$2^{-\Delta\Delta CT}$					
	T98G			T2		
	m	Me	σ	m	Me	σ
<i>TGFβ1</i>	3,91*	3,91 [2,99–5,31]	1,05	2,53	2,53 [1,62–3,43]	0,9
<i>VEGF</i>	3,01*	3,01 [1,77–3,78]	0,89	10,17*	10,17 [9,85–10,48]	0,45
<i>FGF(b)</i>	7,08*	7,08 [2,6–9,32]	3,03	4,24*	4,24 [4,03–4,44]	0,29
<i>EGF</i>	2,58*	2,58 [1,92–2,93]	0,57	5,45*	5,45 [4,96–5,94]	0,69
<i>HGF</i>	74,43*	74,43 [66,72–82,14]	7,71	1,71	1,71 [1,35–2,06]	0,5
<i>αSMA</i>	4,5*	4,5 [4,41–4,66]	0,14	1,35	1,35 [1,32–1,39]	0,05
<i>FAP</i>	13,17*	13,17 [8,46–17,88]	4,71	7,61*	7,61 [5,66–10,85]	2,83
<i>THBS1</i>	12,43*	12,43 [11,47–12,91]	0,83	1,4	1,4 [1,37–1,44]	0,05
<i>TNC</i>	290,46*	290,46 [274,37–306,55]	16,09	7,31*	7,31 [6,15–8,46]	1,63
<i>Zeb1</i>	8,1*	8,1 [7,01–9,19]	1,09	4,03*	4,03 [3,2–5,54]	1,31

Таблица 5 — Изменение экспрессии генов в клетках линий A172 и R1 после однократного облучения в дозе 10 Гр

Ген	$2^{-\Delta\Delta CT}$					
	A172			R1		
	m	Me	σ	m	Me	σ
<i>TGFβ1</i>	0,79	0,79 [0,7–0,88]	0,13	0,55	0,55 [0,53–0,56]	0,02
<i>VEGF</i>	1,66	1,66 [1,4–2,21]	0,38	1,66	1,66 [1,79–1,95]	0,19
<i>FGF(b)</i>	0,96	0,96 [0,44–1,31]	0,46	1,29	1,29 [1,2–1,38]	0,13
<i>EGF</i>	2,0	2,0 [1,8–2,19]	0,28	1,46	1,46 [1,28–1,63]	0,25
<i>HGF</i>	2,17	2,17 [1,74–2,71]	0,48	0,33*	0,33 [0,32–0,33]	0,01
<i>αSMA</i>	2,65*	2,65 [2,19–3,1]	0,63	0,97	0,97 [0,9–1,03]	0,09
<i>FAP</i>	1,92	2,07 [1,81–2,15]	0,36	1,12	1,12 [1,06–1,17]	0,08
<i>THBS1</i>	1,7	1,7 [1,03–2,17]	0,59	0,5	0,5 [0,48–0,52]	0,03
<i>TNC</i>	0,76	0,8 [0,44–0,93]	0,18	0,64	0,64 [0,62–0,66]	0,03
<i>Zeb1</i>	1,28	1,28 [1,0–1,32]	0,06	1,14	1,14 [1,0–1,27]	0,19

Таблица 6 — Изменение экспрессии генов в клетках линий T98G и T2 после однократного облучения в дозе 10 Гр

Ген	$2^{-\Delta\Delta CT}$					
	T98G			T2		
	m	Me	σ	m	Me	σ
<i>TGFβ1</i>	2,14	2,14 [1,49–2,79]	0,92	1,08	1,08 [0,95–1,2]	0,18
<i>VEGF</i>	1,2	1,2 [1,06–1,34]	0,2	7,99*	7,99 [6,73–9,25]	1,78
<i>FGF(b)</i>	2,03	2,03 [1,43–2,62]	0,84	1,65	1,65 [1,31–1,99]	0,48
<i>EGF</i>	2,13	2,13 [1,16–3,1]	1,37	1,48	1,48 [1,34–1,61]	0,19
<i>HGF</i>	0,55	0,55 [0,53–0,57]	0,03	1,0	1,0 [0,96–1,04]	0,06
<i>αSMA</i>	0,93	0,93 [0,56–1,29]	0,51	0,82	0,82 [0,73–0,9]	0,12
<i>FAP</i>	3,18*	3,18 [2,69–3,66]	0,69	4,4*	4,4 [3,87–4,92]	0,74
<i>THBS1</i>	1,56	1,56 [1,19–1,93]	0,52	1,41	1,41 [1,21–1,6]	0,28
<i>TNC</i>	3,64	3,64 [1,34–5,94]	3,25	4,17*	4,17 [3,58–4,76]	0,83
<i>Zeb1</i>	2,11*	2,11 [2,03–2,19]	0,11	2,6*	2,6 [2,4–2,79]	0,28

Таблица 7 — Изменение экспрессии генов в клетках линий A172 и R1 после фракционированного облучения в суммарной дозе 36 Гр

Ген	$2^{-\Delta\Delta CT}$					
	A172			R1		
	m	Me	σ	m	Me	σ
<i>TGFβ1</i>	0,74	0,74 [0,51–0,96]	0,32	0,36*	0,36 [0,33–0,38]	0,04
<i>VEGF</i>	1,04	1,04 [0,88–1,19]	0,22	0,68	0,68 [0,67–0,68]	0,01
<i>FGF(b)</i>	0,78	0,78 [0,57–0,98]	0,29	1,49	1,6 [1,21–1,67]	0,25
<i>EGF</i>	2,07	2,49 [1,47–2,83]	0,62	0,96	0,99 [0,81–1,07]	0,13
<i>HGF</i>	0,64	0,72 [0,36–0,83]	0,25	0,22*	0,22 [0,18–0,26]	0,06
<i>αSMA</i>	3,47*	3,47 [3,41–3,53]	0,08	1,1	1,01 [0,88–1,33]	0,23
<i>FAP</i>	1,19	1,19 [0,8–1,57]	0,54	0,71	0,71 [0,69–0,72]	0,02
<i>THBS1</i>	1,48	1,48 [1,37–1,58]	0,15	1,36	1,34 [1,26–1,47]	0,11
<i>TNC</i>	0,44*	0,44 [0,33–0,54]	0,15	0,37*	0,37 [0,33–0,41]	0,06
<i>Zeb1</i>	1,02	1,02 [1,0–1,04]	0,03	1,19	1,19 [0,94–1,45]	0,36

Таблица 8 — Изменение экспрессии генов в клетках линий T98G и T2 после фракционированного облучения в суммарной дозе 50 Гр

Ген	$2^{-\Delta\Delta CT}$					
	T98G			T2		
	m	Me	σ	m	Me	σ
<i>TGFβ1</i>	0,75	0,75 [0,7–0,8]	0,07	0,95	0,95 [0,9–0,99]	0,06
<i>VEGF</i>	1,29	1,29 [1,14–1,44]	0,21	11,82*	11,82 [9,99–13,64]	2,58
<i>FGF[b]</i>	7,35*	7,35 [6,54–8,17]	1,15	3,42*	3,42 [2,87–3,97]	0,78
<i>EGF</i>	2,99*	2,99 [2,17–3,81]	1,16	2,87*	2,87 [2,77–2,97]	0,14
<i>HGF</i>	4,39*	4,39 [3,16–5,62]	1,73	1,43	1,43 [1,33–1,52]	0,13
<i>αSMA</i>	0,96	0,96 [0,93–0,98]	0,04	0,94	0,94 [0,82–1,05]	0,16
<i>FAP</i>	7,36*	7,36 [7,26–7,46]	0,14	4,15*	4,15 [3,73–4,56]	0,59
<i>THBS1</i>	5,78*	5,78 [4,96–6,59]	1,15	0,5	0,5 [0,45–0,53]	0,03
<i>TNC</i>	99,97*	99,97 [93,05–106,89]	9,79	6,5*	6,5 [5,98–7,01]	0,73
<i>Zeb1</i>	2,11*	2,11 [1,4–2,81]	0,99	4,88*	4,88 [4,63–5,13]	0,35

Таблица 9 — Изменение экспрессии генов в клетках линии T98G после облучения в дозе 10 Гр и повторного облучения в дозе 20 Гр

Ген	$2^{-\Delta\Delta CT}$		
	m	Me	σ
<i>TGFβ1</i>	2,71*	2,71 [2,6–2,81]	0,15
<i>VEGF</i>	3,66*	3,66 [3,29–4,03]	0,52
<i>FGF[b]</i>	15,84*	15,84 [13,64–20,25]	3,82
<i>EGF</i>	5,15*	5,15 [4,35–5,94]	1,12
<i>HGF</i>	57,66*	57,66 [49,52–65,8]	11,51
<i>αSMA</i>	4,49*	4,49 [3,84–5,13]	0,91
<i>FAP</i>	19,21*	17,15 [16,22–24,25]	4,39
<i>THBS1</i>	7,56*	6,82 [6,68–9,19]	1,41
<i>TNC</i>	279,55*	279,55 [265,03–294,07]	20,53
<i>Zeb1</i>	8,06*	8,52 [6,92 – 8,75]	0,99

Примечание: $2^{-\Delta\Delta CT}$ – кратность разницы между экспрессией гена в облученных и интактных клетках). m – среднее арифметическое, Me – медиана, в квадратных скобках указаны верхнее и нижнее значения, σ – стандартное отклонение. Экспрессия генов в интактных клетках принята за единицу; * – достоверность различия при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни).