

ГЛИОМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В КЛЕТОЧНЫХ КЛАСТЕРАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ОБЩУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ

Никитин П.В.¹, Рыжова М.В.¹, Галстян С.А.¹, Зубова И.В.¹, Хохлова Е.А.¹

¹ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко», Москва, e-mail: redseadog@gmail.com

Современные подходы к лечению глиобластом (ГБ) как самых злокачественных первичных опухолей центральной нервной системы отличаются низкой степенью эффективности. Одним из ключевых факторов в вопросе резистентности ГБ к терапевтическим воздействиям является внутриопухолевая гетерогенность. При этом в клеточном составе ГБ выделяется популяция клеток, обладающая наибольшим потенциалом резистентности к химиотерапии и лучевой терапии – глиомные стволовые клетки (ГСК). Данная популяция разделяется на два типа клеток: пронеурональные ГСК и мезенхимальные ГСК. Мы решили оценить распределения данных типов ГСК в различных тканевых нишах ГБ, топографически разделяя ткань ГБ на выявленные ранее клеточные кластеры: перинекротический (ПНК), транзиторный некротический (ТНК), периваскулярный (ПВК), транзиторный васкулярный (ТВК) и промежуточный кластеры (ПК). Кроме того, мы изучили взаимосвязь содержания различных типов ГСК как в разных кластерах, так и в опухоли в целом с общей выживаемостью пациентов. Мы выяснили, что пронеурональные ГСК преобладают в ПВК, в то время как мезенхимальные ГСК наиболее часто встречаются в ТНК. При этом относительно высокое содержание пронеурональных ГСК также наблюдается в ТВК и ПК. Также мы установили, что уровень пронеурональных ГСК в ПВК и мезенхимальных ГСК в ТНК значительно влияют на общую выживаемость пациентов. На основании полученных данных мы предлагаем комплексную концепцию прогрессирования ГБ.

Ключевые слова: глиомные стволовые клетки, клеточные кластеры в глиобластоме, общая выживаемость.

GLIOMA STEM CELLS IN GLIOBLASTOMA CELL CLUSTERS AND THEIR EFFECT ON OVERALL PATIENT SURVIVAL

Nikitin P.V.¹, Ryzhova M.V.¹, Galstyan S.A.¹, Zubova I.V.¹, Khokhlova E.A.¹

¹N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, e-mail: redseadog@gmail.com

Modern approaches to the treatment of glioblastomas (GBM) as the most malignant primary tumor of the central nervous system are characterized by a low degree of effectiveness. One of the key factors in the issue of GBM resistance to therapeutic effects is intratumor heterogeneity. At the same time, a population of cells with the highest potential for chemotherapy and radiation therapy resistance, glioma stem cells (GSC), is distinguished in the cellular composition of GBM. This population is divided into two cells types – proneuronal GSCs and mesenchymal GSCs. We decided to evaluate the distribution of these GSC types in different GBM tissue niches by topographically dividing GBM tissue into previously identified cell clusters – perinecrotic (PNC), transient necrotic (TNC), perivascular (PVC), transient vascular (TVC) and intermediate clusters (IC). In addition, we studied the relationship between the content of various types of GSCs both in different clusters and in the tumor as a whole with the overall survival of patients. We found that proneuronal GSCs prevail in PVC, while mesenchymal GSCs are most common in TNC. Moreover, a relatively high content of proneuronal GSCs is also observed in TVC and IC. We also found that the level of proneuronal GSCs in PVC and mesenchymal GSCs in TNC significantly affect the overall survival of patients. Based on the data obtained, we offer a comprehensive concept for the progression of GBM.

Keywords: glioma stem cells, cell clusters in glioblastoma, overall survival.

Несмотря на существенный прогресс и значимые достижения в онкологии в целом, особенно в эпоху таргетной терапии, в нейроонкологии ситуация более сложная. Самой распространенной первичной злокачественной опухолью центральной нервной системы является глиобластома (ГБ) [1]. Все исследования по разработке и внедрению в клиническую практику препаратов таргетной терапии ранее не увенчались успехом [2]. Одной из

возможных причин подобных трудностей в разработке лечебных подходов могут являться глиомные стволовые клетки (ГСК). ГСК, как и неопухолевые стволовые клетки, способны к самообновлению и могут давать начало различным клеткам-предшественникам, а также более дифференцированным клеточным линиям [3].

Генетические, эпигенетические и протеомические свойства ГСК схожи с молекулярными свойствами нейрональных стволовых клеток [4]. Многие авторы полагают, что именно ГСК являются главными виновниками нечувствительности опухоли к химиотерапии и лучевой терапии, а также служат одной из основных причин рецидивирования злокачественных глиом после хирургического лечения [5].

Полногеномное профилирование позволило выделить два различных подтипа ГСК: пронеуральный и мезенхимальный [6]. Мезенхимальные ГСК в основном возникают в первичных ГБ, тогда как пронеуральные ГСК могут обнаруживаться в некоторых глиомах Grade III по ВОЗ и ГБ, хотя в данном случае возможны выраженные фенотипические сдвиги между различными подтипами ГСК в ходе прогрессирования ГБ [6; 7]. Пронеуральные ГСК могут приобретать терапевтическую устойчивость и более агрессивные характеристики путем смещения их молекулярного и фенотипического подтипа в сторону мезенхимальных ГСК [7]. Данные недавних исследований свидетельствуют о том, что этот сдвиг вызывает увеличение инвазивности и ангиогенного потенциала опухоли по сравнению с пронеуральными ГСК [6]. Мезенхимальные ГСК заметно более устойчивы к воздействию лучевой терапии по сравнению с их пронеуральными аналогами, и воздействие лучевой терапии на пронеуральные ГСК активирует экспрессию молекулярных маркеров, связанных с мезенхимальной дифференцировкой, в то же время подавляя маркеры, ассоциированные с пронеуральными клетками [6; 7]. При этом маркером пронеуральных ГСК является CD133, в то время как важнейшим маркером мезенхимальных ГСК служит CD109 [8; 9].

Ранее в наших предыдущих исследованиях нам удалось с применением методик кластерного анализа и собственных алгоритмов обработки комплексных изображений выделить в ткани ГБ пять клеточных кластеров на основе оценки пролиферативной и антиапоптозной активности. В их число вошли *перинекротический* кластер (ПНК), расположенный вокруг зоны некрозов, *транзиторный некротический* кластер (ТНК), непосредственно окружающий ПНК, *периваскулярный* кластер (ПВК), расположенный вокруг сосудов, *транзиторный васкулярный* кластер (ТВК), находящийся вокруг ПВК, и *промежуточный* кластер (ПК), располагающийся в зоне между 4 другими кластерами [10].

Цель исследования: изучить пространственное распределение пронеуральных и мезенхимальных ГСК, используя их маркеры CD133 и CD109, в различных кластерах, описанных нами ранее в ГБ. Также мы решили оценить влияние иммунофлуоресцентной

выраженности экспрессии CD133 и CD109 как в опухоли в целом, так и в каждом кластере в отдельности на общую выживаемость пациентов с ГБ.

Материал и методы исследования

Группа исследования

В рамках ретроспективного исследования были изучены 48 образцов опухолей от пациентов с установленным диагнозом ГБ без выявленных мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* (WHO Grade IV). Все пациенты, включенные в исследование, проходили хирургическое лечение в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» в 2012-2014 годах. Гены *IDH1* и *IDH2* на предмет наличия мутационных изменений исследовались с помощью методов прямого секвенирования и полимеразной цепной реакции с ДНК-зондами. Для подсчета показателей общей выживаемости все пациенты проходили динамическое наблюдение в течение 5 лет.

Иммуногистохимическое исследование

Парафиновые блоки с фиксированными в них образцами опухолей использовали для изготовления срезов 3 микрометра толщиной. Далее проводили депарафинирование с помощью ксилола и гидратирование с применением различных концентраций спиртов, срезы высушивали в термостате при 45 °С. После этого стекла со срезами последовательно инкубировали с кроличьими моноклональными антителами против антигена Ki-67 человека (CONFIRM anti-Ki67, «Roche-Ventana»), мышинными моноклональными антителами против антигена человека Bcl-2 (CONFIRM anti-bcl-2, «Roche-Ventana»), мышинными моноклональными антителами против антигена человека BCL6 (клон GI191E/A8, Cell Marque, «Sigma-Aldrich», США), и после этого конъюгировали с антикроличьими мышинными (в случае с Ki-67) и антимышиными кроличьими (в случае Bcl-2 и BCL6) IgG антителами против пероксидазы хрена. Сайты связывания антител визуализировали с использованием тетрагидрохлорида 3,3'-диаминобензидина (Ventana Medical Systems, США), ядра клеток окрашивали гематоксилином.

Первичный анализ изображений

Препараты тщательно отцифровывались с помощью сканера Aperio AT2 (Leica Biosystems, GmbH). Затем все изображения в формате SVS максимально точно сопоставлялись по координатным и топографическим данным с получением сложных комплексных файлов с использованием программного обеспечения Aperio ImageScope (Leica Biosystems, GmbH), ImageJ (Национальный институт здравоохранения, США) и QuPath (University of Edinburgh, Division of Pathology, Великобритания). Далее данные комплексные файлы, содержащие комплексные изображения, подвергались медианной фильтрации для модификации цветового диапазона с помощью программного обеспечения ImageJ, Adobe

Photoshop (Adobe Systems, США) и QuPath. Также использовалось нерезкое маскирование всех изображений с применением программного обеспечения Aperio ImageScope, ImageJ и QuPath. С использованием программных алгоритмов и под контролем оператора выделялись границы сосудов и некрозов в опухолевых образцах. Далее производился кластерный анализ комплексных файлов и изображений по методу k-средних с применением программного обеспечения Matlab (The MathWorks, США) и SPSS Statistics 23 (IBM, США). В основе процесса кластеризации лежал ранее использованный алгоритм, основанный на определении для каждого пикселя в изображении показателей в семивекторной системе, учитывающей координатное положение пикселя, расстояние пикселя до края сосуда и некроза, значения показателей цветности по шкале RGB. Характеристики цветности рассчитывались и интерпретировались по разработанной и описанной нами ранее методике [11]. Применяя данный алгоритм, проводили определение пяти ранее описанных кластеров в каждом образце опухоли.

Иммунофлуоресцентное исследование

Также образцы были подвергнуты иммунофлуоресцентному исследованию. Из парафиновых блоков с фиксированными в них образцами опухоли изготавливали серийные срезы толщиной 3 микрометра с одинаковой ориентацией изучаемого фрагмента ткани. Сначала образцы депарафинировали и регидратировали, последовательно погружая предметные стекла в ксилол, 100, 95, 70, 50%-ный этанол, деионизированную воду. Срезы высушивали в термостате при 45 °С. Затем срезы инкубировали с первичными моноклональными антителами к CD133 (Sigma-Aldrich, США) и первичными моноклональными антителами к CD109 (Sigma-Aldrich, США), разведенными в 1%-ном растворе PBS при комнатной температуре, в течение 1–2 часов. Затем образцы в течение ночи инкубировали при 4 °С во влажной камере. После этого срезы дважды промывали с 1%-ным раствором PBS-T в течение 10 минут. Далее добавляли флуоресцентную метку конъюгированного вторичного антитела, разведенного в 1%-ном растворе PBS, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1–2 часов. Далее срезы дважды промывали с 1% PBS-T в течение 10 минут. Затем наносили краситель DAPI. После инкубации с красителем слайды промывали один раз в течение 5 минут с PBS.

Вторичный анализ флуоресцентных изображений

Все флуоресцентные препараты отцифровывались с применением сканера стекол Aperio VERSA (Leica Biosystems, GmbH) в флуоресцентном режиме. Проводилось сопоставление данных изображений с комплексными изображениями, полученными на предыдущих этапах, с выделением кластеров в флуоресцентных изображениях с применением программного обеспечения Matlab и SPSS Statistics 23. Затем проводился

автоматизированный подсчет процента клеток, экспрессирующих CD133 (ПКл CD133) и CD109 (ПКл CD109), в препарате в целом и в отдельных кластерах в ткани ГБ с вычислением средних значений для каждого кластера.

Статистика

Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программного обеспечения SPSS Statistics 23 и STATISTICA 8 (StatSoft, США). Средние значения ПК CD133 и ПК CD109 подвергались сравнению между различными кластерами, и проводилась оценка значимости данных различий с использованием U-критерия Манна-Уитни. Также для выявления влияния АЭ CD133 в опухоли в целом и в различных кластерах на прогноз общей выживаемости пациентов применялся регрессионный анализ по методу Кокса с подсчетом отношения рисков (ОР). Различия считали значимыми при $p < 0.05\%$.

Результаты исследования и их обсуждение

Общая статистика исследованной группы

В группе исследования средний возраст пациентов на момент операции составлял 58.16 ± 2.58 года. По гендерному составу преобладали мужчины в 58.33%, женщины составили 41.67% исследованных. Наиболее часто встречались опухоли височной доли, они выявлялись в 35.42% случаев, за ними следовали опухоли лобной доли, что составило 25% случаев, опухоли теменной доли обнаруживались в 22.92% случаев, опухоли затылочной доли встречались в 14.58%, и 2.08% опухолей выявлялись в стволе. Общая пятилетняя выживаемость составила 4.17% (рис. 1).

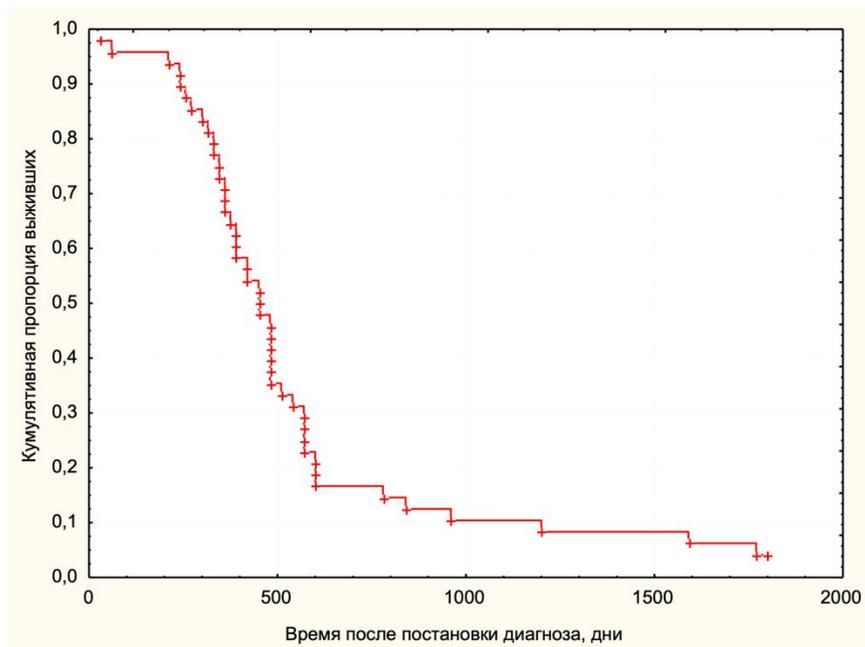


Рис. 1. Кривая Каплана-Майера общей выживаемости пациентов, включенных в исследование. По оси ординат обозначена кумулятивная пропорция выживших, по оси абсцисс – время от постановки диагноза в днях

Распределение пронейрональных ГСК в различных кластерах в ГБ

Сравнительный анализ средних значений ПКл CD133 показал, что самое высокое содержание данного типа клеток выявляется в ПВК и составляет $38.43 \pm 2.65\%$. Далее по значениям ПКл CD133 следует ТВК, в котором данный показатель составляет $28.11 \pm 1.96\%$. За ним расположился ПК с показателями ПКл CD133, составляющими $18.14 \pm 2.6\%$. Наиболее низкие значения ПКл CD133 наблюдались в ПНК и ТНК, в которых они составляли $2.87 \pm 1.16\%$ и $4.14 \pm 1.23\%$ соответственно (рис. 2).

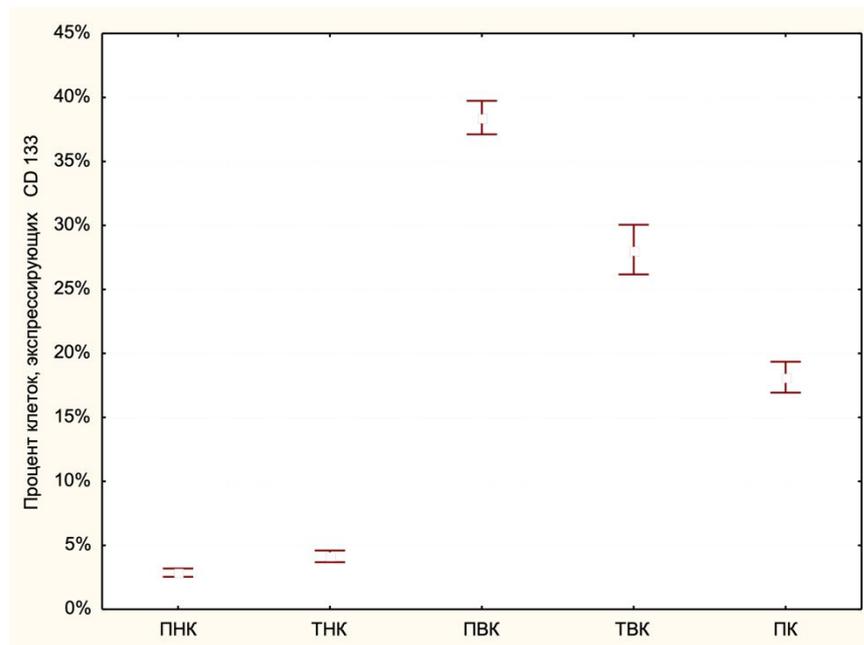


Рис. 2. Распределение нейрональных глиомных стволовых клеток в различных кластерах глиобластомы. По оси ординат приведено значение процента клеток, экспрессирующих маркер CD133, по оси абсцисс обозначены пять кластеров, в том числе перинекротический (ПНК), транзиторный некротический (ТНК), периваскулярный (ПВК), транзиторный васкулярный (ТВК) и периферический кластеры (ПК)

При этом необходимо отметить, что значения ПКл CD133 статистически значимо различались между всеми кластерами (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение средних значений процента клеток, экспрессирующих маркер CD133, в различных кластерах в глиобластоме

Кластеры	ПНК	ТНК	ПВК	ТВК	ПК
ПНК	-	p=0.000023;	p=0.00007;	p=0.000012;	p=0.000081;

		Z=8.37	Z=8.44	Z=8.42	Z=8.44
ТНК	p=0.0056; Z=4.37	-	p=0.000018; Z=8.41	p=0.000061; Z=8.43	p=0.000078; Z=8.43
ПВК	p=0.000063; Z=8.44	p=0.000042; Z=8.41	-	p=0.000578; Z=6.75	p=0.000034; Z=8.44
ТВК	p=0.000021; Z=8.42	p=0.00001; Z=8.43	p=0.00042; Z=6.75	-	p=0.00056; Z=6.72
ПК	p=0.000048; Z=8.44	p=0.000068; Z=8.43	p=0.000084; Z=8.44	p=0.00048; Z=6.72	-

Примечание. Различия между всеми кластерами были статистически значимыми.

Наличие мезенхимальных ГСК в различных кластерах в ГБ

При рассмотрении распределения клеток, экспрессирующих маркер CD109, было выявлено, что наиболее высокий ПКл CD109 наблюдается в ТНК, где он составил 44.22 ± 2.54 . Затем по уровню ПКл CD109 следуют ПВК и ТВК, в которых средние значения ПКл CD 109 являются близкими и составляют $18.15 \pm 1.54\%$ и $16.59 \pm 1.75\%$. Несколько меньшие показатели ПКл CD109 наблюдаются в ПНК, в котором он составляет $12.62 \pm 2.61\%$. Самые низкие значения ПКл CD109 наблюдаются в ПК и составляют в среднем $10.41 \pm 2.64\%$ (рис. 3).

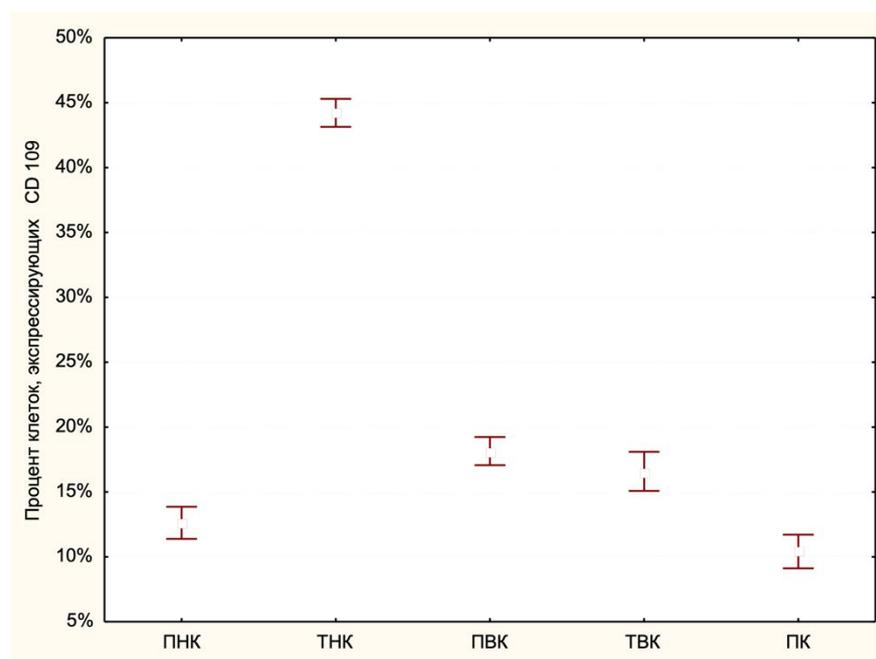


Рис. 3. Распределение мезенхимальных глиомных стволовых клеток в различных кластерах глиобластомы. По оси ординат приведено значение процента клеток, экспрессирующих маркер CD109, по оси абсцисс обозначены пять кластеров, в том числе перинекротический (ПНК), транзиторный некротический (ТНК), периваскулярный (ПВК), транзиторный васкулярный (ТВК) и периферический кластеры (ПК)

При проведении межкластерных сравнений средних значений ПК CD109 было выявлено, что показатели ПК CD109 статистически значимо различаются между большинством кластеров за исключением ПВК и ТВК (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение средних значений процента клеток, экспрессирующих маркер CD109, в различных кластерах в глиобластоме

Кластеры	ПНК	ТНК	ПВК	ТВК	ПК
ПНК	-	p=0.00008; Z=8.44	p=0.00086; Z=5.72	p=0.0009; Z=3.53	p=0.01; Z=2.56
ТНК	p=0.000043; Z=8.44	-	p=0.000028; Z=8.44	p=0.000016; Z=8.44	p=0.000034; Z=8.44
ПВК	p=0.00017; Z=5.72	p=0.000042; Z=8.44	-	p=0.121; Z=6.75	p=0.00056; Z=6.69
ТВК	p=0.0006; Z=3.53	p=0.000084; Z=8.44	p=0.121; Z=6.75	-	p=0.00042; Z=5.23
ПК	p=0.01; Z=2.56	p=0.000031; Z=8.44	p=0.00081; Z=6.69	p=0.00041; Z=5.23	-

Примечание. Статистически значимые различия выделены красным цветом.

Преобладающие типы ГСК в различных кластерах

При проведении дополнительного анализа по преобладанию одного из типов ГСК в различных кластерах в ГБ, было выявлено, что пронеурональные ГСК статистически значимо чаще встречаются, нежели мезенхимальные ГСК в ПВК (p<0.001; Z=8.44), ТВК (p<0.001; Z=6.93) и ПК (p<0.001; Z=6.6). При этом мезенхимальные ГСК наблюдаются чаще пронеурональных ГСК в ПНК (p<0.001; Z=8.24) и ТНК (p<0.001; Z=8.44). Таким образом,

ПВК, ТВК и ПК характеризуются преобладанием пронеурональных ГСК, в то время как ПНК и ТНК отличаются преобладанием мезенхимальных ГСК.

Влияние активности экспрессии CD133 и CD 109 на прогноз пациентов

В ходе проведения регрессионного анализа было выявлено, что ПК CD133 при подсчете его в опухоли в целом не влияет на общую выживаемость пациентов с ГБ. Дифференцированный подход к определению влияния ПК CD 133, подсчитанного отдельно в каждом кластере, на прогноз показал, что ПК CD 133 только в ПВК значимо влияет на общую выживаемость пациентов с ГБ (табл. 3).

Что касается мезенхимальных ГСК, то было выявлено, что ПК CD 109 в опухоли в целом не влияет значимо на общую выживаемость. При этом отдельная оценка влияния значений ПК CD 109 в каждом кластере на прогноз пациентов выявила, что ПК CD109 только в ТНК значимо влияет на общую выживаемость пациентов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние значений процента клеток, экспрессирующих маркеры CD133 и CD109, на показатели общей выживаемости пациентов в опухоли в целом и в различных кластерах в глиобластоме

Кластеры	ПНК	ТНК	ПВК	ТВК	ПК	Опухоль в целом
CD133	p=0.326; ОР=1.15	p=0.175; ОР=0.87	p=0.003; ОР=1.11	p=0.262; ОР=0.97	p=0.401; ОР=0.98	p=0.468; ОР=1.08
CD109	p=0.271; ОР=1.04	p=0.000016; ОР=1.24	p=0.274; ОР=0.96	p=0.25; ОР=1.04	p=0.611; ОР=1.02	p=0.061; ОР=1.19

Примечание. В соответствующих ячейках таблицы приведены значения p и отношения рисков (ОР). Влияние на общую выживаемость оценивалось с помощью регрессии Кокса, статистически значимые параметры выделены красным цветом.

Полученные нами результаты демонстрируют неоднородность распределения различных типов ГСК в разных клеточных кластерах в ГБ. Пронеурональные ГСК формируют стволовый пул опухолевых клеток-предшественников в области периваскулярной ниши. Это обуславливает самую высокую степень пролиферативной активности в данной области, входящей в состав ПВК, что нашло свое подтверждение в нашем первом исследовании по данной тематике [10]. Хорошо известно, что пронеурональные ГСК обладают повышенной подвижностью и инвазивностью, они могут распространяться в мозговой ткани на достаточно большие расстояния, мигрируя в ранее непораженные зоны мозговой ткани [12]. Далее они активно пролиферируют и увеличивают

опухолевую массу на данном участке. Важнейшим фактором, обеспечивающим подобную экспансию опухоли, являются новообразованные опухолевые сосуды, появляющиеся в результате процессов неоангиогенеза, активное участие в реализации и инициации которых также принимают пронейрональные ГСК [13]. Это создает благоприятные условия для дальнейшей опухолевой прогрессии, однако с ростом числа опухолевых клеток в данной зоне и увеличением общей потребности ткани в кислороде и питательных веществах появляется и нарастает состояние гипоксии. Это ещё больше повышает нагрузку на неполноценные в структурном и функциональном плане опухолевые сосуды и приводит к повреждению их эндотелия, что влечет за собой развитие многочисленных тромбозов [14]. Это еще больше усиливает гипоксические условия и стимулирует опухолевые клетки в данной зоне, в том числе клетки со стволовыми свойствами, к выраженной фенотипической трансформации, способствующей выживанию опухолевых клеток и сохранению ими свойств злокачественности. В конечном счете дальнейшее прогрессирование прогипоксических изменений приводит к гибели части опухолевых клеток и возникновению некроза, при этом клетки в перинекротической зоне продолжают оставаться в условиях выраженной гипоксии.

Наши результаты показывают, что в ходе этого патогенетического процесса на уровне ГСК происходит фенотипический сдвиг в сторону мезенхимального типа. При этом мезенхимальные ГСК сохраняют высокую подвижность и инвазивность, присущую опухолевым клеткам со стволовыми свойствами, и перемещаются из зон вокруг некрозов, соответствующих ПНК, в соседние участки, менее подверженные гипоксическим изменениям и входящие в состав ТНК. Это позволяет не только эффективно бороться с нарастающими гипоксическими условиями, но и сохранить стволовые свойства и пролиферативный потенциал опухоли, что также было доказано нашим предшествующим исследованием. В нем мы показали, что ТНК обладает вторым по степени выраженности пролиферативным потенциалом в ткани ГБ после ПВК [10].

Мезенхимальные ГСК, подверженные действию гипоксии, активно экспрессируют прогипоксический транскрипционный фактор HIF1 α , что в свою очередь индуцирует продукцию ими ангиогенных факторов [14]. Это запускает процессы неоангиогенеза в данной зоне и приводит к появлению новообразованных сосудов, что существенно улучшает условия снабжения кислородом и питательными веществами опухолевых клеток, в том числе мезенхимальных ГСК. Это, в свою очередь, приводит к очередному проявлению фенотипической пластичности ГСК – они вновь претерпевают трансформацию в пронейрональные ГСК. Тем не менее любопытен тот факт, что при значительном преобладании пронейрональных ГСК в ПВК, там же обнаруживаются и небольшие, но четко определяемые количества мезенхимальных ГСК. Это может быть связано с несколькими

факторами. ПВК является самым пролиферативно активным клеточным кластером в ГБ, поэтому в нем при высокой потребности в кислороде и большом содержании ГСК часть клеток может находиться в выражено гипоксических условиях вследствие того, что кислородных и питательных ресурсов всем клеткам не хватает. Это может приводить к тому, что часть клеток сохраняет мезенхимальный профиль или переключается на него повторно.

При этом клинические данные показывают, что процентное содержание различных типов ГСК в тех кластерах, в которых они преобладают, то есть ПВК для пронейрональных ГСК и ТНК для мезенхимальных ГСК, значимо взаимосвязано с прогнозом общей выживаемости пациентов. Причем наиболее выражено на прогноз влияют не пронейрональные ГСК, а мезенхимальные ГСК. С чем же это может быть связано? Как уже указывалось выше, мезенхимальные ГСК имеют большую устойчивость не только к воздействию гипоксии, но и ряда других повреждающих факторов, причем не только эндогенного, но и экзогенного генеза, в том числе к лечебным воздействиям. Так, показано, что мезенхимальный фенотип в ГБ может существенно повышать устойчивость к применению химиотерапии и лучевой терапии.

Заключение

Таким образом, основываясь на наших результатах и литературных данных, мы формулируем новую патогенетическую концепцию. Она важна не только для улучшения понимания механизмов канцерогенеза ГБ, но и имеет непосредственное практическое применение, причем как в диагностической, так и в лечебной плоскости: прецизионная оценка молекулярных свойств отдельных клеточных кластеров и популяций, а также их терапевтическое таргетирование открывают широчайшие перспективы в разработке новых, более эффективных персонализированных подходов к диагностике и лечению ГБ.

Список литературы

1. Ostrom Q.T., Gittleman H., Fulop J., Liu M., Blanda R., Kromer C., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro. Oncol.* 2015. V. 17 Suppl 4. P. iv1-iv62. DOI: 10.1093/neuonc/nov189.
2. Popescu A.M., Purcaru S.O., Alexandru O., Dricu A. New perspectives in glioblastoma antiangiogenic therapy. *Contemp Oncol. (Pozn).* 2016. V.20(2). P. 109-118. DOI: 10.5114/wo.2015.56122.
3. Kreso A., Dick J.E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell. Stem. Cell.* 2014. V.14(3). P. 275-291. DOI: 10.1016/j.stem.2014.02.006.

4. Rispoli R., Conti C., Celli P., Caroli E., Carletti S. Neural stem cells and glioblastoma. *Neuroradiol. J.* 2014. V. 27(2). P. 169-174. DOI: 10.15274/NRJ-2014-10028.
5. Osuka S., Van Meir E.G. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J. Clin. Invest.* 2017. V. 127(2). P. 415-426. DOI: 10.1172/JCI89587.
6. Mao P., Joshi K., Li J., Kim S.H., Li P., Santana-Santos L., Luthra S., Chandran U.R., Benos P.V., Smith L., Wang M., Hu B., Cheng S.Y., Sobol R.W., Nakano I. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2013; 110(21):8644-9. DOI: 10.1073/pnas.1221478110.
7. Minata M., Audia A., Shi J., Lu S., Bernstock J., Pavlyukov M.S., Das A., Kim S.H., Shin Y.J., Lee Y., Koo H., Snigdha K., Waghmare I., Guo X., Mohyeldin A., Gallego-Perez D., Wang J., Chen D., Cheng P., Mukheef F., Contreras M., Reyes J.F., Vaillant B., Sulman E.P., Cheng S.Y., Markert J.M., Tannous B.A., Lu X., Kango-Singh M., Lee L.J., Nam D.H., Nakano I., Bhat K.P. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation. *Cell Rep.* 2019. V. 26(7). P. 1893-1905.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.076.
8. Yamamuro S., Okamoto Y., Sano E., Ochiai Y., Ogino A., Ohta T., Hara H., Ueda T., Nakayama T., Yoshino A., Katayama Y. Characterization of glioma stem-like cells from human glioblastomas. *Int. J. Oncol.* 2015. V. 47(1). P. 91-96. DOI: 10.3892/ijo.2015.2992.
9. Zhang J.M., Murakumo Y., Hagiwara S., Jiang P., Mii S., Kalyoncu E., Saito S., Suzuki C., Sakurai Y., Numata Y., Yamamoto T., Takahashi M. CD109 attenuates TGF- β 1 signaling and enhances EGF signaling in SK-MG-1 human glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2015. V. 459(2). P. 252-258. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.093.
10. Никитин П.В., Рыжова М.В., Зубова И.В., Панина Т.Н., Шугай С.В. Гетерогенность опухолевых клеток в глиобластомах // *Архив патологии.* 2019. Т. 81(3). С. 27-36. DOI: 10.17116/patol20198103127.
11. Nikitin P.V., Ryzhova M.V., Shishkina L.V., Shugay S.V., Zubova I.V. Study of Simple Immunohistochemical Cytocolorimetric Assay Application for More Accurate Assessment of Prognosis in Patients with Pituitary Adenomas. *World Neurosurg.* 2019. V. 122. P. e1047-e1051. DOI: 10.1016/j.wneu.2018.10.225.
12. Munthe S., Sørensen M.D., Thomassen M., Burton M., Kruse T.A., Lathia J.D., Poulsen F.R., Kristensen B.W. Migrating glioma cells express stem cell markers and give rise to new tumors upon xenografting. *J. Neurooncol.* 2016. V. 130(1). P. 53-62.
13. Bao S., Wu Q., Sathornsumetee S., Hao Y., Li Z., Hjelmeland A.B., Shi Q., McLendon R.E., Bigner D.D., Rich J.N. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2006. V. 66(16). P. 7843-7848.

14. Colwell N., Larion M., Giles A.J., Seldomridge A.N., Sizdahkhani S., Gilbert M.R., Park D.M. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro Oncol.* 2017. V. 19(7). P. 887-896. DOI: 10.1093/neuonc/now258.