

17. Пащенко В.П., Сидоров П.И., Борисов И.Н., Чуркин Н.Л. Влияние сыворотки крови больных алкоголизмом на рост первичных культур почечных клеток плодов человека. Невропатология и психиатрия, 1987, 87(2): 237-239 .

**ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ В
ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СТВОЛОВЫХ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО
МОЗГА**

В.М. Семенова, Д.М. Егорова, Л.П. Стайно

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

seveme22@rambler.ru

В настоящем обзоре освещены современные представления о биологических свойствах стволовых опухолевых клеток в злокачественных глиомах головного мозга, их роли в гистогенезе этих опухолей и взаимоотношениях с нейральными стволовыми клетками нейрогенераторных зон головного мозга. Показаны возможности использования метода культивирования в изучении нейросферообразования – фундаментального свойства стволовых опухолевых клеток. Приведены методические подходы к получению нейросфер в условиях культивирования, а также способы идентификации стволовых опухолевых клеток в составе нейросфер. Представлены результаты количественной оценки активности нейросферообразования в культуре клеток злокачественных глиом, отражающие степень анаплазии исходных опухолей, позволяющие прогнозировать исходы заболеваний у нейроонкологических больных. Описаны перспективы практического использования культивируемых нейросфер с целью поиска антибластических препаратов с избирательным воздействием на стволовые опухолевые клетки глиом.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки, нейральные стволовые клетки, нейросферы, глиомы головного мозга, метод культивирования тканей.

К настоящему времени накоплено большое количество данных, предполагающих, что злокачественные глиальные опухоли головного мозга формируются из популяции недифференцированных нейроклеток-прогениторов (1). В литературе эта популяция

самообновляющихся клеток с опухоленными свойствами определяется как стволовые опухолевые клетки (СОК), обладающие большим сходством с нейральными стволовыми клетками (НСК) нейрогенераторных зон нормального мозга (2, 3). Подобно НСК, СОК глиом способны к самовоспроизведению и экспрессии маркеров первичных нейронов и глиоцитов – астроцитов и олигодендроцитов (4, 5, 6). Однако, в отличие от нормальных НСК, СОК функционируют нерегулируемым образом и являются важным звеном в инициации, поддержании и прогрессировании первичного и продолженного роста глиом головного мозга. Установлено также, что содержание СОК в ткани глиом нарастает пропорционально повышению степени их злокачественности и сопровождается повышением уровней экспрессии иммуноцитохимических маркеров их стволовых свойств (4, 7, 8, 9). Общеизвестно, что наличие СОК в различных типах опухолей, включая глиомы головного мозга, связано с неблагоприятным прогнозом заболевания (10, 11, 12, 13, 14).

При использовании методических подходов, принятых в исследованиях НСК нормального мозга для изучения СОК глиом, была установлена тесная взаимосвязь между нормальным нейрогенезом и опухоленезом. При этом идентификация СОК в ткани головного мозга обеспечивает получение важной информации, необходимой для дальнейшего исследования разносторонних аспектов опухоленности в ЦНС, а также для разработки оптимизированных методов лечения глиом, направленных на уничтожение СОК. Показано, что наличие популяции СОК в ткани злокачественных глиом обуславливает их клеточную гетерогенность, так как изменчивость морфофункциональных характеристик СОК со временем способствует накоплению в них генетических мутаций, что приводит к развитию резистентности глиом к химиолучевой терапии (2, 15, 16, 17, 18).

Идентификация СОК в клетках злокачественных глиом производится, в первую очередь, с помощью иммуноцитохимического выявления экспрессии нестина – маркера НСК (19, 20). В то же время, по наблюдениям Singh S.K. с соавт. (21), наличие экспрессии CD133+ в СОК злокачественных глиом является достаточным и необходимым условием для инициации опухолевого роста после трансплантации СОК в мозг иммунодефицитных мышей.

Показано также, что экспрессия генов эмбриональных стволовых клеток в СОК глиобластом (ГБМ) – наиболее злокачественных глиом головного мозга – определяет их агрессивную опухоленность (22). По данным K. Mishima с соавт. (23), D. R. Larks с соавт. (24), R.H. Dahlrot с соавт. (25) экспрессия стволовых маркеров – подопланина (PDPN), CD133+ и

нестина в СОК злокачественных глиом может служить прогностическими факторами клинических исходов. В то же время рядом авторов признаки экспрессии стволовых маркеров в СОК не признаются прогностически значимыми (26, 27, 28). Таким образом, уточненная идентификация и клеточный генез СОК в глиомах головного мозга до сих пор остаются полностью невыясненными. Углубленное изучение биологии СОК в этих новообразованиях с помощью иммуноцитохимических и молекулярно-генетических методов исследования представляет важное направление на современном этапе.

Важная роль в этих исследованиях принадлежит методу культивирования клеток, который позволяет выделять из ткани опухолей популяцию СОК, формирующих нейросферы, и отслеживать прижизненную динамику их роста. Как отмечают D.R. Larks с соавт. (24), возобновляемое формирование нейросфер (туморосфер) в культуре является фундаментальным свойством СОК, определяющим инициацию и рост опухолей в ткани головного мозга.

Интересно отметить, что способность СОК в глиальных опухолях к нейросферообразованию была впервые открыта благодаря применению методики выделения НСК в условиях культивирования нервной ткани в бессывороточной среде с добавлением митогенов, основного фактора роста фибробластов и эпидермального фактора роста (29). Использование этой методики при культивировании опухолей мозга показало, что клетки ГБМ также могут формировать нейросферы (30). В последующем была установлена способность клеток нейросфер дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты, что позволило отнести их к СОК (31). Однако в отличие от клеток нейросфер, полученных из нормальной нервной ткани, клетки опухолевых нейросфер (туморосфер) имеют генетические нарушения, подвержены нерегулируемой пролиферации, а также индуцируют развитие инвазивной злокачественной глиомы при введении в мозг иммунодефицитных мышей. При этом активность роста опухоли коррелирует с активностью нейросферообразования в культуре (32).

По современным представлениям принадлежность культивируемых клеток к СОК доказывается на основании следующих критериев: а) генерация кластеров клональных производных, формирующих нейросферы в культуре; б) самообновление и пролиферация опухолевых клеток; в) дифференцировка с воспроизведением фенотипа клеток исходной

опухоли; г) экспрессия иммуноцитохимических маркеров СОК в нейросфероподобных клеточных кластерах.

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

Так, существенное влияние на эффективность и динамику нейросферообразования культивируемых СОК оказывает первоначальная плотность посева опухолевых клеток. Установлено, что при низкой клеточной плотности посева из образующихся микроагрегатов НСК в бессывороточной среде с наличием ростовых факторов формируются неадгезивные колониальные клеточные скопления – нейросферы (29). Показано, что клетки, изолированные из глиом детей и глиобластом взрослых пациентов, при низкой плотности посева в бессывороточных средах также способны формировать нейросферы с высокой способностью к пролиферации и самообновлению. Эти клетки могут проявлять потенции к мультилинейной дифференцировке в нейрональные и глиальные линии с образованием некоторого количества аномальных клеток со смешанным фенотипом (16).

В отличие от этого при высокой плотности посева нейросферы могут агрегировать и слипаться между собой (33). Поэтому количественную оценку нейросферобразования в культуре следует считать достоверной лишь при первоначально низкой плотности посева опухолевых клеток. ($<1 \times 10^5$ кл/мл) (34). Несмотря на эти ограничения, метод культивирования нейросфер считается высокоинформативным способом изучения биологии СОК злокачественных глиом.

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

В опытах Qiang L. с соавт. (35) установлено, что обработка сывороткой нейросфер, полученных в культуре ГБМ, ведет к астроглиальной дифференцировке части клеток. С

другой стороны, в ряде адгезивных линий ГБМ, культивированных на средах с содержанием сыворотки, также могут образовываться нейросферы.

Gilbert C.A. с соавт. (36) традиционно выращивали в адгезивной культуре клетки ГБМ в присутствии сыворотки, при этом большинство формирующихся нейросфер проявляли туморогенные свойства. Однако часть этих культур, в отличие от исходных опухолей пациентов с ГБМ, не обладали инвазивными свойствами опухолевого роста при трансплантации в мозг иммунодефицитных мышей. При этом культивированные клетки нейросфер экспрессировали высокие уровни иммуноцитохимических маркеров дифференцировки, поэтому такие культуры, по мнению авторов, оказались непригодными для изучения биологии СОК.

Показано, что клетки нейросфер, полученных при культивировании глиальных опухолей мозга в сывороточных средах, экспрессируют такие гены НСК, как *Musashi-1* (*Msi-1*), *Sox2*, и *Bmi-1* (37). Однако в бессывороточных питательных средах клетки нейросфер воспроизводят профиль генной экспрессии исходной опухоли более точно, чем в культурах с содержанием сыворотки (8). Таким образом, ключевым фактором при культивировании нейросфер является использование бессывороточных сред определенного состава, что обеспечивает пролиферацию СОК в составе нейросфер, поскольку лишь в этих условиях СОК воспроизводят популяцию клеток с генами, характерными для НСК, и имеют меньше генетических альтераций (36).

Важно отметить, что при культивировании ряда экспериментальных глиальных клеточных линий индивидуальная вариабельность выхода СОК в разных линиях колеблется в пределах 1-30%, что обусловлено их различной способностью формировать нейросферы. В этих экспериментах установлено также, что большинство клеток в составе нейросфер относятся к более дифференцированным транзиторно-амплифицированным клеткам (38).

По наблюдениям Lee J.C. с соавт. (8) активность нейросферообразования и морфология нейросфер в бессывороточных питательных средах меняются со временем на протяжении 4 месяцев культивирования. Gilbert C.A. с соавт. (36) наблюдали видоизменение структуры нейросфер на протяжении более 20 пассажей от плотных кластеров с почти индивидуально неразличимыми клетками до более рыхлых клеточных скоплений.

По общему мнению, на воспроизводимость нейросферообразования СОК глиом в условиях культивирования оказывает влияние также время проведения диссоциации нейросфер. Так,

при более ранней их диссоциации доля нейросферо-инициирующих клеток увеличивается, а при более поздней диссоциации нейросфер повышается вероятность клеточной гибели.

Среди методических приемов, оказывающих влияние на эффективность нейросферообразования СОК, большое значение придается также способам диссоциации нейросфер. Наиболее часто для получения суспензии отдельных клеток используется механическая диссоциация нейросфер при помощи пипетирования. Наряду с этим применяется также диссоциация нейросфер с помощью ряда ферментов. Однако использование, к примеру, протеаз, может вызывать повреждение поверхностных клеточных мембран и маркеров, в частности, CD133+, что приводит к недооценке количества СОК в клеточной суспензии и неэффективной их сортировке. Тем не менее, многие лаборатории успешно получают культуры нейросфер из ГБМ, используя ферментативную диссоциацию ткани опухоли при культивировании клеток в бессывороточной среде с добавлением ростовых факторов (8, 39, 24, 40, 41).

Метод pH-диссоциации нейросфер является менее жестким по отношению к клеткам, чем традиционная механическая диссоциация, и не влияет на свойства СОК в культуре. Так, Gilbert C.A. с соавт. (36) применили короткую диссоциацию нейросфер в сильно щелочной среде при мягком пипетировании и благодаря этому обеспечили эффективное поддержание опухолевых нейросфер в культурах на протяжении многих пассажей.

Изучение структуры нейросфер представляет определенные трудности. Так, наличие дифференцированных клеточных потомков и возникновение очажков некроза в нейросферах, образующихся в результате плотной клеточной упаковки, угнетает диффузию ростовых факторов к большинству клеток (42).

Facchino S. с соавт. (43) показали, что очищенные CD133+ клетки ГБМ головного мозга образуют нейросферы в культуре, а в присутствии индукторов дифференцировки могут дифференцироваться в глиальные клетки и нейроны. По мнению авторов, CD133+-клетки, выделенные из ГБМ, могут индуцировать очень агрессивные глиальные опухоли при трансплантации в мозг мышей в экспериментах *in vivo*. Такие опухоли резистентны к химио- и радиотерапии, и именно они ответственны за развитие опухоли и ее продолженный рост после традиционного хирургического лечения пациентов с ГБМ.

Yi L. с соавт. (44) обнаружили, что нейросферы, полученные в культурах клеток из первичной ГБМ человека, а также из мышинной клеточной линии ГБМ (GL261-NS), при

введении в мозг сингенных мышей продемонстрировали повышенную туморогенность, образуя злокачественные глиомы в мозге этих животных.

Показано также, что опухолевые клетки, полученные из образцов человеческих глиом, могут расти и как адгезивные культуры на обработанных ламинином субстратах в бессывороточной среде для культивирования нейросфер. Преимуществом адгезивных культур является равномерно эффективный доступ ко всем клеткам монослоя ростовых факторов, препятствующих дифференцировке и апоптозу. В адгезивных культурах глиом СОК менее гетерогенны в сравнении с культурой нейросфер и почти все клетки экспрессируют гены СОК - Sox2, Nestin, CD133+ и CD44+. Лишь некоторые из этих клеток экспрессируют маркеры дифференцировки. При внутримозговой инъекции иммунокомпетентным мышам лишь 100 клеток из адгезивных культур формировали инвазивные глиальные опухоли. В связи с этим считается, что адгезивные культуры СОК представляют превосходную систему для скрининга эффективности лекарств, т.к. они способны продуцировать адгезивные клеточные линии из всех оцениваемых глиом с хорошей клеточной жизнеспособностью (6).

Ravon L.F. с соавт. (45) разработали оптимальный метод получения нейросфер из первичной культуры ГБМ человека с последующим отбором субпопуляции CD133+-клеток, формирующих субсферы, в клетках которых были идентифицированы маркеры GFAP, CD133+, nestin, Nanog, CD34+, Sox2, CD44+ та CD90+. Авторы установили, что нейросферы, полученные из первичной культуры ГБМ, содержат на 29% больше клеток, экспрессирующих CD133+ в сравнении с клетками из нативной опухоли. Это означает более высокую концентрацию CD133+-клеток в нейросферах, образующихся именно в первичной культуре ГБМ, в которых около 89% клеток экспрессируют CD133+ против 60% CD133+-клеток, полученных из нативной опухоли.

В работе Li S.C. с соавт. (46) рассмотрен вопрос о признаках идентичности и отличий СОК и НСК из нейрорегенераторных регионов субвентрикулярных и гиппокампальных зон головного мозга. При этом особое внимание уделено маркеру НСК CD133+, который с большим постоянством выявляется в клетках глиом головного мозга, особенно в ГБМ. Авторы выявили высокий уровень его экспрессии в ткани исследованных глиом, а также в клеточных линиях глиомы U251 и U87MG. Однако остается неясным, происходят ли CD133+ СОК от CD133+ нормальных НСК (35). В связи с этим в литературе активно обсуждается вопрос о

разработке противоопухолевой терапии, направленной на повреждение именно опухолевых CD133+ стволовых клеток без повреждения нормальных НСК.

Li S.C. с соавт. (46) удалось также изолировать СОК из ткани редкого типа ГБМ человека, поражавшей нейрогенераторную зону стенки бокового желудочка головного мозга. Микроскопически эта опухоль имела характерную гистоструктуру ГБМ с выраженным клеточным полиморфизмом, высокой митотической активностью и наличием некротических очагов различной протяженности. Выделенные из ткани этой ГБМ CD133+-клетки экспрессировали также маркеры СОК: нестин, CD133+, Ki67, Sox2, EFNB1, EFNB2, EFNB3, Cav-1, Musashi, Nucleostemin, Notch2, Notch4, Pax6. В бессывороточной среде культур с наличием факторов роста EGF и bFGF CD133+-клетки формировали нейросферы. Их стволовые свойства подтверждены развитием злокачественной глиомы в мозге иммунодефицитных мышей NOD/SCID после стереотаксической внутримозговой трансплантации.

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

При отсутствии общепринятого набора маркеров СОК Hasselbach L.A. с соавт. (34) предложили использовать клетки, полученные в результате сортировки обычных СОК-обогащенных культур. Клетки ГБМ, отобранные по способности образовывать нейросферы в бессывороточной среде культур с ростовыми факторами, экспрессировали маркеры НСК. При этом экспрессия Sox2 и нестина постоянно выявлялась в НСК нейросфер, в то время как белок CD133+ присутствовал лишь в нейросферах, образованных клетками ГБМ (40).

Hasselbach L.A. с соавт. (34) оптимизировали также протокол ферментативной диссоциации опухолевой ткани ГБМ на материале более 100 образцов. В долгосрочных культурах ГБМ эффективность получения нейросфер составила более 40%. В отличие от культур с наличием 10% FBS такие нейросферы демонстрировали туморогенность,

мультилинейный дифференцировочный потенциал, сохраняли генотип исходной опухоли, а также воспроизводили гистоструктуру оригинальной опухоли после ортотопической имплантации СОК в мозг иммунодефицитных мышей.

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

В другой серии исследований Hasselbach L.A. с соавт. (34) провели сравнительный анализ первичных клеток ГБМ, культивированных либо в среде для нейросфер с добавлением факторов роста (NMGF), либо в традиционной питательной среде с добавлением 10% FBS. Изоляция СОК из диссоциированных тканей ГБМ проводилась при помощи клеточного сортинга, основанного на экспрессии маркера СОК CD133+ (21, 47). При этом оказалось, что фенотип СОК не постоянно связан с экспрессией этого маркера, на что указывают также Beier D. с соавт. (48), Joo K.M. с соавт. (49) и Son M.J. с соавт. (50).

Clement V. с соавт. (51) также считают, что предлагаемый в качестве маркера СОК CD133+ не является достаточно специфичным для идентификации опухолевых клеток со стволовыми свойствами. В связи с этим, авторами предложен альтернативный метод, основанный на фенотипических признаках глиома-инициирующих клеток без использования молекулярных маркеров, а именно, на способности исследуемых клеток к аутофлуоресценции в зеленой области спектра (515 нм) после лазерного облучения при длине волны 488 нм. Показано, что клетки этой субпопуляции, названные FL-плюс, способны к самообновлению *in vitro*, туморогенезу *in vivo* и избирательно экспрессируют гены стволовых клеток. Приведенные результаты авторы расценивают как предварительные, предполагая, что аутофлуоресценция FL-плюс-клеток может отражать их более высокую метаболическую и пролиферативную активность. По мнению авторов, данный метод в исследовании туморогенного потенциала СОК может оптимизировать разработку новых терапевтических и диагностических подходов в лечении глиом человека.

Таким образом, в многочисленных исследованиях, посвященных методам изоляции и идентификации СОК в злокачественных глиомах головного мозга, метод культивирования нейросфер получил широкое распространение и стал определяющим подходом в изучении

биологии СОК благодаря сохранению молекулярных особенностей СОК исходных тканей ГБМ и их туморогенного потенциала (8, 16, 24, 30, 39, 41, 52, 53).

Несмотря на значительный объем накопленных исследований по биологии СОК опухолей головного мозга, проведенных в условиях культивирования, образуемые ими туморосферы практически не изучались в морфологическом и ультраструктурном аспекте. G.Bozzuto с соавт. (54) при помощи методов прижизненной визуализации и сканирующей электронной микроскопии изучали подвижность СОК в нейросферах с целью наблюдения за межклеточными взаимодействиями и взаимоотношениями клеток с окружающей средой. Установлено, что СОК туморосфер, изолированных из образцов мультиформной ГБМ, оказались разнородными по составу и морфологии, а также по степени подвижности и способности к образованию динамичных структур. Установлено, что такие динамичные структуры регулируются неслучайными межклеточными взаимодействиями, синхронно пульсируют соответственно циклическому курсу «быстрых» и «медленных» фаз. Полученные авторами данные указывают на то, что СОК из ГБМ могут вести себя как отдельные «независимые» клетки, так и как «социальные» клетки, взаимодействующие с другими клетками этой популяции по образцу «многоклеточного организма». По данным авторов, уровень экспрессии протеина Wnt 5a коррелирует с уровнем ассоциации клеток в нейросферах (54).

Yamamuro S. с соавт. (55) провели исследование с помощью метода трансмиссивной электронной микроскопии антигенных и ультраструктурных характеристик СОК, изолированных из глиобластомы человека. Установлено, что туморосферы, сформированные разным количеством клеток, варьировали по размерам и форме, и очень часто проявляли экспрессию поверхностных маркеров стволовых клеток CD133 и CD15. В СОК отмечались повышенная ядерная атипия, активные митохондрии, грубый эндоплазматический ретикулум, покрытый везикулами, и микроворсинки. Кроме того, иногда наблюдались клетки в фазе деления и апоптоза. Эти результаты обосновывают предположение об определенной взаимосвязи СОК с НСК человека, однако СОК отличаются более примитивной ультраструктурой в отличие от недифференцированных НСК. Эти данные позволяют углубить представления об онкогенезе глиобластом/глиом, и также способствовать разработке терапии, направленной на СОК в качестве мишени.

Важный практический интерес представляют исследования, в которых анализируется прогностическое значение активности нейросферообразования в культуре и экспрессии маркеров СОК для клинической нейроонкологии (22, 32, 56, 57, 58, 59). В этих работах прослежена тесная взаимосвязь между клиническими исходами и содержанием СОК в ткани глиом головного мозга, что подтверждается также формированием туморосфер в культуре, клетки которых выявляют экспрессию стволовых маркеров и генетических признаков СОК (9, 10, 11, 12, 13, 22, 24, 32, 56, 57, 58, 59, 60).

Так, Laks D.R. с соавт. (24) в ретроспективном исследовании на образцах 32 глиом в культуре изучали соотношение между способностью клеток этих опухолей к нейросферообразованию, туморогенностью и исходами болезни пациентов. На основании мультивариантного анализа взаимосвязи между этими показателями установлено, что активность формирования нейросфер является стойким прогностическим признаком прогрессии глиомы, исхода заболевания, а также повышенного риска смерти пациента независимо от индекса пролиферации Ki67 в исходной ткани опухоли. Это позволило утверждать, что культура нейросфер является информативной моделью для исследования биологии злокачественных глиом как в теоретическом, так и практическом аспектах.

Kong B.H. с соавт. (61) при культивировании образцов ГБМ 39 пациентов, получавших после операции химиотерапию и радиотерапию, наблюдали формирование туморосфер, в которых СОК экспрессировали иммуноцитохимические маркеры PDPN, CD133+ и нестин, а также проявляли способность к нейрогенной дифференцировке и индукции туморогенеза *in vivo*. Анализ зависимости уровней нейросферообразования СОК в культуре и критериев выживаемости пациентов показал статистически достоверные различия критериев выживаемости у позитивных и негативных по выявлению СОК в опухолях пациентов с первичной ГБМ. Kong B.H. с соавт. (61) также считают, что оценка активности туморосферообразования ГБМ в культуре является независимым прогностическим фактором клинического исхода у этих пациентов. В то же время, авторы предполагают, что в связи с временной длительностью культивирования опухолей для получения нейросфер этот метод может оказаться неприемлемым для прогнозирования исхода болезни при первичных ГБМ с коротким периодом выживаемости пациентов. В таких случаях более предпочтительной является оценка экспрессии поверхностных антигенов СОК в нативной ткани этих опухолей.

Углубленное изучение биологии СОК приобрело особо важное теоретическое и практическое значение для совершенствования методов повышения эффективности адъювантной терапии злокачественных глиом головного мозга. Этой цели посвящены исследовательские разработки ряда мировых лабораторий. Предполагается, что именно субпопуляция СОК должна стать критической терапевтической мишенью для достижения полного или долгосрочного ответа злокачественных глиом на их терапевтическое лечение (57, 62, 63). При этом следует учитывать, что СОК принадлежит ключевая роль в образовании новых кровеносных сосудов, обеспечивающих прогрессивный и продолженный рост злокачественных глиом в послеоперационном периоде (64).

К настоящему времени установлено, что клетки глиомы, обогащенные субпопуляцией СОК, выявляют повышенную резистентность к облучению – основному стандартному средству в лечении злокачественных глиом после частичной хирургической резекции. Это объясняется тем, что именно СОК активируют пути внутриклеточного ответа на радиационные повреждения ДНК, быстро их репарируя (47). McCord с соавт. (66) на первичных культурах нейросфер, полученных из глиобластомы, показали более высокую чувствительность к ионизирующему излучению CD133+клеток этой опухоли. В первичных культурах глиом человека была установлена большая радиочувствительность СОК в сравнении с клетками перевиваемых линий глиом.

Ke C. с соавт. (66) использовали сфероидальные и адгезивные культуры глиомы (U251, A172) для сравнительного изучения воздействия радиационного облучения на метаболический статус опухолевых клеток. Установлено, что через неделю после облучения сфероидальные культуры, по сравнению с адгезивными, показали большую радиочувствительность с повышенным уровнем оксидантного стресса при более низких уровнях окислительного фосфорилирования и гликолитического метаболизма. В отличие от этого радиорезистентные несфероидальные адгезивные культуры демонстрировали повышенную гликолитическую активность в ответ на облучение, тогда как окислительное фосфорилирование оказалось затронутым в меньшей степени. Таким образом, эти данные показали, что разные клеточные субпопуляции адаптируются к определенным условиям культивирования, изменяя свои биоэнергетические профили, что в свою очередь влияет на чувствительность глиальных опухолевых клеток к радиационному облучению (66).

Ранее K. Mishima с соавт. (23) и A. Ernst с соавт. (67) сообщали, что экспрессия PDPN оказалась прогностически значимой у пациентов с глиомами астроцитарного генеза. Экспрессию нестина в СОК T. Strojnik с соавт. (56) и CD133+ R. Pallini с соавт. (58) связывали с плохими исходами опухолей мозга и многих раков. Однако при анализе взаимосвязи между экспрессией отдельных иммуноцитохимических маркеров PDPN+, CD133+ и нестина в СОК культур и выживаемостью пациентов с ГБМ Kong B.H. с соавт. (61) не удалось выявить отчетливых закономерностей. Так, оказалось, что среднее время выживаемости в группах больных с позитивной и негативной экспрессией PDPN в СОК оказалось сходным, составляя 400 и 408 дней соответственно. При этом экспрессия CD133+ и нестина выявлена в культивированных СОК у большинства пациентов. Лишь в одном случае наблюдалась негативная экспрессия этих маркеров в культурах клеток ГБМ, поэтому авторы не смогли провести статистическое сравнение этих 2-х групп. Аналогичные результаты получены Chinnaiyan P. с соавт. (68).

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

Наиболее перспективными моделями являются клетки из высокоинвазивных интракраниальных опухолей мышей линии СТ-2А, полученной из злокачественной астроцитомы, индуцированной с помощью интрацеребрального введения 20-methylcholanthrene мышам C57/BL6 (18). На культурах нейросфер этой линии Binello E. с соавт. (18) подтвердили стволовые свойства СОК, а также оптимизировали воспроизводимость инъекционных параметров.

Binello E. с соавт. (18) также считают очевидным участие СОК в развитии глиом человека высокой степени злокачественности, резистентных к стандартной терапии, и обнаружили, что показатели экспрессии маркера СОК - CD133+ в культурах СТ-2А увеличиваются с 2% в клетках монослоя до 31% в клетках нейросфер. Исследование других маркеров СОК (Oct4, Nanog и Nestin) показало различия характеристик клеток монослоя, экспрессирующих Oct4 и Nestin, но не Nanog, и клеток нейросфер, экспрессирующих все три маркера. Кроме того, клетки СТ-2А проявили более высокую активность пролиферации и туморогенность по

сравнению с клетками U87. При этом клетки нейросфер линии СТ-2А имели более высокий пролиферативный потенциал, чем клеточный монослой *in vitro*. В связи с этим авторы предлагают использовать эту модель в доклиническом тестировании новых терапевтических средств против СОК глиом человека высокой степени злокачественности (18).

Burkhardt J.K. с соавт. (69) провели сравнительное исследование воздействия ряда химиотерапевтических агентов на нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСК) и на СОК глиомы на культурах клеточных линий НСК и СОК. Показано, что НСК в сравнении с СОК оказались более уязвимыми к токсическому воздействию, в частности, темозоламида и карбоплатина, которые наиболее часто используются для химиотерапии злокачественных глиом. Классическая экспрессия гена MGMT была сходной в обеих клеточных линиях и не объясняет наблюдаемых различий в резистентности клеток к темозоламиду. В то же время не отмечено различий между СОК и НСК в экспрессии репарирующих ферментов MLH1 и MLH2, ответственных за развитие резистентности к цисплатину. Однако СОК глиомы показали в 10 раз более высокий уровень транспортного белка ABCG2, который способствует удалению из клетки токсичных препаратов. Этим объясняется множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток глиом к химиопрепаратам.

Авторы обнаружили также, что бортезомиб (BTZ) - протеасомный ингибитор, и эрлотиниб (ERL) - ингибитор тирозинкиназы, снижали жизнеспособность СОК, минимально воздействуя на НСК. После лечения больных BTZ установлено значительное повышение активности caspase-3 - ключевого фермента апоптоза в СОК при отсутствии этого признака в НСК. Однако в отличие от СОК глиом активность протеасом в НСК оказалась повышенной в 5-7 раз. Эффект воздействия ERL на СОК глиом Burkhardt J.K. с соавт. (69) объясняют более высоким уровнем экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), в отличие от НСК.

Gong X. с соавт. (70) показали, что протеасомный ингибитор bortezomid (BTZ) и рецептор EGF роста - ингибитор тирозинкиназы erlotimib (ERL)- снижают пролиферацию именно СОК глиом, не влияя на жизнеспособность НСК. В то же время установлено, что широко применяемые для лечения глиом темозолимиб (TMZ) и цисплатин оказались более токсичными для нормальных НСК в сравнении с СОК. Таким образом, обнаружено, что классические химиотерапевтические препараты, используемые для лечения ГБМ, в условиях *in vitro* выявляют различные эффекты воздействия на НСК и СОК.

Заключение

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

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

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

С помощью метода культивирования экспериментальных клеточных линий глиом удалось выявить также индивидуальные колебания количества опухолевых стволовых клеток в различных глиальных линиях, что свидетельствует о разной способности формировать нейросферы в связи с отличающимся соотношением между содержанием активно пролиферирующих СОК и более дифференцированных транзиторно-амплифицированных клеток в ткани исходных опухолей.

В последние годы культуры нейросфер, полученные из опухолей мозга человека и экспериментальных животных, стали использовать для тестирования активности противоопухолевых препаратов на доклиническом этапе. Благодаря этим исследованиям получены важнейшие данные для современной практической нейроонкологии. Оказалось, что классические химиотерапевтические препараты, используемые для лечения ГБМ – наиболее злокачественных глиом головного мозга - в условиях культивирования выявляют различные эффекты воздействия на нормальные НСК и СОК.

Основным выводом проанализированных работ является необходимость поиска лекарственных средств, избирательно воздействующих на СОК глиом, не затрагивая при этом здоровую ткань мозга и нормальные НСК. Эти наблюдения инициируют новые направления исследований в поисках повреждающих агентов, специфичных для СОК и не влияющих на нормальные НСК. Анализ результатов приведенной литературы подтверждает актуальность разработки новых терапевтических подходов, направленных против СОК глиальных опухолей головного мозга с привлечением экспериментального метода культивирования.

Список литературы

1. **Gursel D.B., Shin B.J., Burkhardt J-K., Kesavabhotla K., Schlaff C.D., Bookvar J.A.** Glioblastoma Stem-Like Cells. Biology and Therapeutic Implications. *Cancers*. 2011, 3 (2): 2655-2666.
2. **Park D.M., Rich J.N.** Biology of Glioma Cancer Stem Cells. *Mol.Cells*. 2009, 28: 7-12.
3. **Лисяный Н.И.** Иммунология и иммунотерапия злокачественных глиом головного мозга. Серия «Нейроиммунология». К.: Интерсервис. 2011, 5: 240 с.

4. **Wang J.C.** Evaluating Therapeutic efficacy against cancer stem cells: New challenges posed by a new paradigm. *Cell Stem Cell*. 2007, 1: 497-501.
5. **Bleau A.M., Howard B.M., Taylor L.A., Gursel D., Greenfield J.P., Lim Tung H.Y., Holland E.C., Boockvar J.A.** New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans. *Neurosurg. Focus*. 2008, 24 (3-4): E28.
6. **Pollard S.M., Yoshikawa K., Clarke I.D., Danovi D., Stricker S., Russell R., Bayani J., Head R., Lee M., Bernstein M.** Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell*. 2009, 4: 568-580.
7. **Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M.S.** Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med*. 2005, (353): 811-822.
8. **Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N.M., Pastorino S., Purow B.W., Christopher N., Zhang W.** Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*. 2006, 9: 391-403.
9. **Kong B. H., Park N.-R., Shim J.K. Kim B.K., Shin H.J., Lee J.H. et al.** Isolation of glioma cancer stem cells in relation to histological grades in glioma specimens. *Child's Nervous System*. 2013, 29 (2): 217–229.
10. **Kok M., Koornstra R.H., Margarido T.C., Fles R., Armstrong N.J., Linn S. C., Van't Veer L.J., Weigelt B.** Mammosphere-derived gene set predicts outcome in patients with ER-positive breast cancer. *The Journal of Pathology*. 2009, 218 (3): 316–326.
11. **Kim H.S., Yoo S.Y., Kim K.T., Park J.T., Kim H.J., Kim J.C.** Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2012, 5 (8): 754–761.
12. **Pirozzi G., Tirino V., Camerlingo R. La Rocca A., Martucci N., Scognamiglio G., Franco R., Cantile M., Normanno N., Rocco G.** Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer. *Oncology Reports*. 2013, 29 (5): 1763–1768.
13. **Bao B., Ali S., Ahmad A., Li Y., Banerjee S., et al.** Differentially expressed miRNAs in cancer-stem-like cells: markers for tumor cell aggressiveness of pancreatic cancer. *Stem Cells and Development*. 2014, 23 (16): 1947–1958.
14. **Wang X., Ren H., Zhao T., Chen J., Sun W. et al.** Stem cell factor is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Carcinogenesis*. 2014, 35 (10): 2283–2290.
15. **Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.** Stem cells cancer and cancer stem cells. *Nature*. 2001, 414: 105-111.
16. **Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawjins C., Squire J., Dirks P.B.** Identification of Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res*. 2003, 63 (18): 5821-5828.
17. **Sulman E., Aldape K., Colman H.** Brain tumor stem cells. *Current Problems in Cancer*. 2008, 32 (3): 124–142.
18. **Binello E., Qadeer Z.A., Kothari H.P., Emdad L., Germano I.M.** Stemness of the CT-2A Immunocompetent Mouse Brain Tumor Model: Characterization In Vitro. *J.Cancer*. 2012, 3: 166-174
19. **Dahlstrand J., Collins V.P., Lendahl U.** Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer res*. 1992, 52: 5334 – 5341.
20. **Tohyama T., Lee V.M., Rorke L.B., Marvin M., McKay R.D., Trojanovski J.Q.** Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab.Invest*. 1992, 66: 303-313.

21. **Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B.** Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature*. 2004, 432: 396-401
22. **Ben-Porath I., Thomson N.W., Carev V.J., Ge R., Bell G.W., Ragev A., Weinberg R.A.** An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat.Genet.* 2008, 40: 499 – 507.
23. **Mishima K., Kato Y., Kaneko M. K., Nishikawa R., Hirose T., Matsutani M.** Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathologica*. 2006, 111 (5): 483–488.
24. **Laks D.R., Masterman-Smith M., Visnyei K., Angenieux B., Orozco N.M. et al.** Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *StemCells*. 2009, 27 (4): 980-987.
25. **Dahlrot R.H., Hermansen S.K., Hansen S., Kristensen B.W.** What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2013, 6 (3): 334–348.
26. **Christensen K., Schröder H. D., Kristensen B.W.** CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*. 2008, 90 (2): 157–170.
27. **Kim K.J., Lee K.H., Kim H.S., Moon K.S., Jung T.Y. et al.** The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas. *Neuropathology*. 2011, 31 (5): 494–502.
28. **Schoppmann S.F., Berghoff A. S., Jesch B., Zacherl J., Nirtl N. et al.** Expression of podoplanin is a rare event in sporadic gastrointestinal stromal tumors and does not influence prognosis. *Future Oncology*. 2012, 8 (7): 859–866.
29. **Reynolds B.A., Tetzlaff W., Weiss S.** A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J.Neurosci.* 1992, 12: 4565- 4574.
30. **Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A.** Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002, 39 (3): 193-206.
31. **Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A. et al.** Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004, 64 (19): 7011-7021.
32. **Zeppernick F., Ahmadi R., Campos B., Dictus C., Helmke B.M. et al.** Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res.* 2008, 14 (1): 123-129.
33. **Singec I., Knoth R., Meyer R.P., Maciaczyk J., Volk B., Nikkhah G., Frotscher M., Snyder E.Y.** Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat. Methods*. 2006, 3: 801-806.
34. **Hasselbach L.A., Irtenkauf S.M., Lemke N.W., Nelson K.K., Berezovsky A.D., Carlton E.T., et al.** Optimization of High Grade Glioma Cell Culture from Surgical Specimens for Use in Clinically Relevant Animal Models and 3D Immunocytochemistry. *J. Vis. Exp.* 2014, 83, e51088: 1-9.
35. **Qiang L., Yang Y., Ma Y.J., Chen F.H., Zhang L.B., Liu et al. W.** Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 2009, 279 (1): 13-21.
36. **Gilbert C.A., Ross A.H.** Cancer Stem cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Therapies. *J.Cell.Biochem.* 2009, 108 (5): 1031-1038.
37. **Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A., Masterman-Smith M., Geschwind D.H., Bronner-Fraser M., Kornblum H.I.** Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*. 2003, 100: 15178-15183.

38. **Ahmed S.** The culture of neural stem cells. *J. Cell Biochem.* 2009, 106: 1-6.
39. **Vescovi A.L., Galli R., Reynolds B. A.** Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer.* 2006, 6: 425-436.
40. **deCarvalho A. C., Nelson K., Lemke N., Lehman N. L., Arbab A. S., Kalkanis S., Mikkelsen T.** Gliosarcoma Stem Cells Undergo Glial and Mesenchymal Differentiation In Vivo. *Stem Cells.* 2010, 28 (2): 181–190.
41. **Azari H., Millette S., Ansari S., Rahman M., Deleyrolle L.P., Reynolds B.A.** Isolation and expansion of human glioblastoma multiforme tumor cells using the neurosphere assay. *J. Vis. Exp.* 2011, 56, e3633: 1-5.
42. **Woolard K., Fine H.A.** Glioma stem cells: better flat than round. *Cell Stem Cell.* 2009, 4: 466-467.
43. **Facchino S., Abdouh M., Chatoo W., Bernier G.** BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J. Neurosci.* 2010, 28 (30): 1096–1111.
44. **Yi L., Zhou C., Wang B., Chen T. Xu M., Xu L., Feng H.** Implantation of GL261 neurospheres into C57/BL6 mice: a more reliable syngenic graft model for research on glioma-initiating cells. *Int.J.Oncol.* 2013, 43 (2): 477-484.
45. **Pavon L.F., Marti L.C., Sibov T.T., Malheiros S.M.F., Brandt R.A., Gamarra S.C.** In vitro analysis of neurospheres derived from glioblastoma primary culture: a novel methodology paradigm. *Front.Neurol.* 2014, 4: 214 – 220.
46. **Li S.C., Long T.V., Ho H.W., Yin H.Z., Keschrumrus V., Lu Q., Wang J. et al.** Cancer stem cells from a rare form of glioblastoma multiforme involving the neurogenic ventricular wall. *Cancer Cell International.* 2012, 12: 41-60.
47. **Bao S., Wu Q., McLendon D.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Binger D.D., Rich J.N.** Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006a, 444: 756-760.
48. **Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhusen J., Oefner P.J., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier C.P.** CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cell show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 2007, 67: 4010-4015.
49. **Joo K. M., Kim S.Y., Jin X., Song S.Y., Kong D.S., Lee J.I.** Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab. Invest.* 2008, 88: 808-815.
50. **Son M.J., Woolard K., Nam D.H., Lee J., Fine H.A.** SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem cell.* 2009, 4: 440-452.
51. **Clement V., Marino D., Cudalbu C., Hamou M-F., Mlynarik V., Tribollet N. et al.** Marker-independent identification of glioma-initiating cells. *Nature Methods.* 2010, 7: 224-228.
52. **Yuan X., Curtin J., Xiong Y. Liu G., Waschmann-Hogiu S., Farkas D. et al.** Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004, 23: 9392-9400.
53. **Germano I.M., Swiss V., Casaccia P.** Primary brain tumors, neural stem cells, and brain tumor cancer cells: Where is the link? *Neuropharmacol.* 2010, 58 (6): 903-910.
54. **Bozzuto G., Toccaceli L., Mazzoleni S., Frustagli G. et al.** Brain tumor stem cell dancing. *Ann Ist Super Sanita.* 2014, 50 (3): 286-290. DOI: 10.4415/ANN_14_03_11.
55. **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. *International Journal of Oncology.* 2015, 47 (1): 91-96. DOI: 10.3892/ijo.2015.2992.

56. **Strojnjk T., R sland G. V., Sakariassen P. O., Kaval r R., Lah T.** Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surgical Neurology*. 2007, 68 (2): 133–143.
57. **Beier D., Rohrl S., Pillai D.R., Schwartz S., Kunz-Schughart L.A. et al.** Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res*. 2008, 68: 5706-5715.
58. **Pallini R., Ricci-Vitiani L., Banna G. L., Signore, M., Lombardi, D., Todaro, M. et al.** Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research*. 2008, 14 (24): 8205–8212.
59. **Zhang M., Song T., Yang L., Chen R., Wu L., Yang Z., Fang J.** Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008, 27: 85-92.
60. **Wang X., Ren H., Zhao T., Chen J., Sun W., Sun Y. et al.** Stem cell factor is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Carcinogenesis*. 2014, 35 (10): 2283–2290.
61. **Kong B.H., Moon J.H., Huh U.M., Shim J.K., Lee J.H. et al.** Prognostic Value of Glioma Cancer Stem Cell Isolation in Survival of Primary Glioblastoma Patients. *Stem Cells International*. 2014, 2014, Article ID 838950. - 6 p.
62. **Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N.** Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res*. 2008. 68: 7043-6048.
63. **Dietrich J. Imitola J., Kesari S.** Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nat.Clin.Pract*. 2008, 5: 393-404.
64. **Bao S., Wu Q., Sathornsumetae 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*. 2006b, 66: 7843-7848.
65. **McCord A.M., Jamal M., Williams E.S., Camphausen K., Tofilon P.J.** CD133+ glioblastoma stem-like cells are radioresistensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin. Cancer Res*. 2009, 15 (16): 5145-5153.
66. **Ke C., Tran K., Chen Y., Di Donato A.T. et al.** Linking differential radiation responses to glioma heterogeneity. *Oncotarget*. 2014, 5 (6): 1657-1665. DOI: 10.18632/oncotarget.1823.
67. **Ernst A., Hofmann S., Ahmadi R., Becker N., Korshunov A., Engel F. et al.** Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival. *Clinical Cancer Research*. 2009, 15 (21): 6541–6550.
68. **Chinnaiyan P., Wang M., Rojiani A.M. Tofilon P.J., Chakravarti A., Ang K.K. et al.** The prognostic value of nestin expression in newly diagnosed glioblastoma: report from the radiation therapy oncology group. *Radiation Oncology*. 2008, 3 (1): 32- 40.
69. **Burkhardt J.K. Shin B.J., Boockvar J.A.** Neural Stem Cells and Glioma Stem-Like Cells Respond Differently to Chemotherapeutic Drugs: Selectivity at the Cellular Level. *Neurosurgery*. 2011, 68 (6): 21-22.
70. **Gong X., Schwartz P.H., Linskey M.E., Bota D.A.** Neural stem/progenitors and glioma stem-like cells have differential sensitivity to chemotherapy. *Neurology*. 2011, 76 (13): 1126-1134.