

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования
«Дальневосточный федеральный университет»

На правах рукописи

КОСЬЯНОВА АЛЕКСАНДРА АСАДОВНА

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛОФАЗИМИНА НА МОДЕЛИ
ГЛИОБЛАСТОМЫ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук, доцент
Брюховецкий И.С.

Санкт-Петербург – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛОФАЗИМИНА И ГЛИОБЛАСТОМА (обзор литературы)	10
1.1 Современное состояние проблемы	10
1.2 Пластичность опухолевых клеток и резистентность к лечению	13
1.3 Опухолевые стволовые клетки и химиотерапия	16
1.4 <i>Wnt</i> -сигнальный путь и микроокружение ОСК	18
1.5 Таргетная терапия и пластичность ОСК	20
1.6 Ингибиторы активности β -катенина и клофазимин	22
1.7 Микроокружение ОСК и клетки костного мозга	25
1.8 Принципы иммунофармакотерапии глиом	28
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1 Материалы, использованные в работе	34
2.2 Методы исследования	38
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	45
3.1 Характеристика клеток, используемых в эксперименте	46
3.1.1 Иммуноцитохимическая опухолевых клеток	46
3.1.2 Иммуноцитохимическая характеристика клеток костного мозга крыс, использованных в эксперименте	49
3.2 Влияние клофазимина на клетки глиобластомы <i>in vitro</i>	51
3.2.1 Влияние клофазимина на подвижность клеток ГБ в тесте зарастания царапины в клеточном монослое	50
3.2.2 Влияние клофазимина на подвижность фармакорезистентных клеток Т98G в тесте зарастания царапины в клеточном монослое	53
3.2.3 Цитотоксическое действие клофазимина на модели глиобластомы	54
3.3 Влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков <i>in vitro</i>	56
3.3.1 Влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков на модели глиобластомы	56

3.3.2	Влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков на фармакорезистентных клетках T98G	63
3.4	Антиглиомная эффективность клофазимина <i>in vivo</i>	66
3.4.1	Нейровизуализационная характеристика опухоли в мозге экспериментальных животных различных групп	66
3.4.2	Характеристика функционального статуса экспериментальных животных с глиомой С6	68
3.4.3	Оценка биохимического статуса у экспериментальных животных различных групп	73
3.5	Морфологическая, иммуногистохимическая характеристика и иммуноферментный анализ опухолевой ткани у животных с глиомой	76
3.5.1	Морфологическая характеристика области введения опухолево-клеточной вакцины в организм животных с глиомой С6 после ХЛТ	76
3.5.2	Оценка морфологических и иммуногистохимических параметров опухоли в мозге крыс исследуемых групп при иммунотерапии	78
3.5.3	Оценка содержания β -катенина в опухолевой ткани по данным иммуногистохимического и иммуноферментного анализа	86
3.6	Выживаемость экспериментальных животных	89
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ		90
4.1	Обсуждение результатов иммуноцитохимической характеристики ОК, используемых в эксперименте	91
4.1.1	Обсуждение результатов иммунофенотипирования клеток ГБ с индуцированной резистентностью к темозоломиду	91
4.1.2	Обсуждение результатов иммуноцитохимической характеристики клеток костного мозга крысы	96
4.2	Обсуждение влияние клофазимина на клетки глиобластомы <i>in vitro</i>	98
4.2.1	Обсуждение влияние клофазимина на подвижность клеток ГБ в тесте застания царапины в клеточном монослое	98
4.2.2	Обсуждение цитотоксического действие клофазимина в отношении клеток различных линий глиобластомы	100

4.3 Обсуждение влияния клофазимина на антиглиомную активность цитостатиков <i>in vitro</i>	101
4.4 Обсуждение влияния клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков на модели глиобластомы с индуцированной резистентностью к темозоломиду	104
4.5 Обсуждение антиглиомной активности клофазимина <i>in vivo</i>	105
4.6 Обсуждение функционального статуса экспериментальных животных	106
4.7 Обсуждение данных гематологического и цитокинового статуса крыс различных групп	107
4.8 Обсуждение результатов морфохимического анализа опухолевых узлов в мозге крыс	109
4.9 Обсуждение выживаемости экспериментальных животных	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	117
Практические рекомендации	118
Список литературы	119
Список условных сокращений и обозначений	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Глиобластома (ГБ) – одна из самых смертоносных опухолей головного мозга человека [31, 105]. Прогноз крайне неблагоприятный, при условии выполнения всех требований современного протокола комплексного лечения ГБ, известного как протокол *Роджера Ступпа* [199], медиана выживаемости больных составляет 15 мес. Последующая комбинация хирургического лечения с химиотерапией иногда может продлить жизнь больного [191, 233]. Наиболее востребованы цитостатики темозоломид (ТМЗ), ломустин и таргетное средство бевацизумаб [243]. Однако химиопрепараты не могут сдержать прогрессирование опухоли [34], поскольку не способны эффективно уничтожать в организме больного опухолевые стволовые клетки (ОСК).

ОСК способны к быстрому самообновлению путем симметричного деления [191], что достигается при активации ряда внутриклеточных механизмов, среди которых ключевую роль играет эмбриональный сигнальный путь *Wnt* [7, 132, 194]. Источником лигандов, активирующих этот сигнальный каскад, является M2-поляризованная микроглия и некоторые другие клетки микроокружения ОСК [84], формирующие «секреторные петли» и продуцирующие *Wnt*-белки в ответ на стимуляцию иммуносупрессивными цитокинами [173]. Подобная стимуляция приводит к повышению уровня β -катенина в цитоплазме ОСК [196], что усиливает фенотипическую пластичность, пролиферативную активность и степень анаплазии опухолевых клеток (ОК), ведет к рецидиву ГБ и предопределяет негативный исход болезни.

Эффективных способов фармакологической коррекции этих механизмов не существует, однако определенные успехи в области иммунотерапии глиом, [17, 62, 238], позволяют предположить, что комбинация лекарственных средств, подавляющих синтез и биологическую активность β -катенина с опухолево-клеточными и дендритноклеточными вакцинами может дестабилизировать взаимоотношение ОСК с локальным иммуносупрессивным микроокружением,

блокировать внутриклеточные механизмы фенотипической гетерогенности и пластичности ОСК, повысить антиглиомную активность цитостатиков и продлить жизнь больного. В этой связи особый интерес представляют перепрофилируемые лекарственные средства, среди которых высокую противоопухолевую активность при раке кишечника, раке яичников, трижды- негативном раке молочной железы и ряде других инвазивных карцином [227], показал противолепрозный препарат клофазимин (КФЗ).

Цель исследования: изучить противоопухолевый потенциал клофазимина на экспериментальных моделях глиобластомы *in vitro* и *in vivo*.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние клофазимина на клетки глиобластомы *in vitro*;
2. Показать влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков *in vitro*;
3. Установить наличие антиглиомного эффекта клофазимина в комбинации с химиолучевой терапией *in vivo*;
4. Описать антиглиомную активность клофазимина при комбинации с иммунотерапией *in vivo*.

Научная новизна

На экспериментальных моделях ГБ *in vitro* показана зависимость между пролиферативной активностью ОК и содержанием в них β -катенина, а также прямая зависимость между содержанием этого белка и резистентностью ОК к ТМЗ. Показано, что увеличением содержания β -катенина ОК становятся более подвижными, что сопровождается усилением экспрессии в них миграционного N-кадгерина и антигенов пронеурального - CD133 и мезенхимального - CD44 фенотипа. Показана способность клофазимина угнетать подвижность клеток ГБ, более выраженная в отношении ОК с индуцированной резистентностью ТМЗ, а также усиление цитостатического действия клофазимина по мере усиления степени анаплазии ОК. Установлено, что клофазимин оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на ОК, эффективность которого обратно пропорциональна степени их дифференцировки и усиливается в комбинации с

темозоломидом: установлены IC_{50} клофазимина в отношении ОК линии С6 - $37,6 \pm 3,2$ мкмоль/л, для линии U87MG и T98G $29,0 \pm 1,3$ мкмоль/л и $38,3 \pm 4,1$ мкмоль/л, соответственно. Показана способность клофазимина усиливать цитотоксическую активность ТМЗ, ломустина, 5-фторурацила в отношении ОК линий С6 и U87MG, а также паклитаксела в отношении клеток ГБ линии T98G, описано усиление антиглиомного действия при комбинации клофазимина с ломустином и карбоплатином в отношении клеток линии T98G с индуцированной резистентностью к ТМЗ.

В эксперименте *in vivo* показана способность клофазимина усиливать цитотоксическое действие химиолучевой терапии (ХЛТ) у крыс с перевитой глиомой, что сопровождается снижением содержания в неопластической ткани β -катенина, уменьшением размера опухоли и улучшением функционального статуса экспериментальных животных. Комбинация ХЛТ с клофазимином и опухолево-клеточной (ОКВ) вакциной сопровождается усилением локального противоопухолевого иммунного ответа и увеличения содержания ИЛ 1β и 18 в сыворотке крови. Комбинация ХЛТ с клофазимином и дендритноклеточной вакциной (ДКВ) обогащает опухолевую ткань маркерами $IBA1^+$ $CD68^+$ клеток М1-поляризованной микроглии, что сопровождается снижением содержания β -катенина в веществе мозга и увеличением выживаемости экспериментальных животных.

Теоретическая и практическая значимость

Создана экспериментальная модель глиобластомы с индуцированной резистентностью к ТМЗ и показана прямая зависимость между содержанием β -катенина в ОК и с наиболее агрессивным иммунофенотипом эпителиально-мезенхимального перехода, характеризующегося усилением анаплазии и модификацией иммуноцитохимического профиля ОК в виде увеличения содержания миграционного N-кадгерина, снижение содержания адгезионного E-кадгерина, экспрессией в ОК антигена CD44, усилением их подвижности и ростом резистентности к ТМЗ и другим противоопухолевым препаратам. Показано цитостатическое и цитотоксическое воздействие на ОК этого типа с

использованием комбинации цитостатиков и клофазимина. Установлены IC_{50} наиболее востребованных в нейроонкологии цитостатиков в отношении ОК с индуцированной резистентностью к ТМЗ и установлены эффективные комбинации ТМЗ, цитостатиков и клофазимина, что позволит внести важные коррективы в существующие клинические рекомендации по лечению ГБ.

Показана возможность усиления противоопухолевого действия ХЛТ при комбинации с клофазимином, а также возможность усиления антиглиомного эффекта лечения при комбинации ХЛТ и клофазимина с экспериментальной иммунотерапией с использованием опухолево-клеточной и дендритно-клеточной вакцин, что сопровождается модификацией микроокружения ОСК и снижением содержания β -катенина в опухолевой ткани и веществе мозга. Возможность увеличения выживаемости экспериментальных животных с перевитой глиомой при использовании клофазимина позволит разработать новые схемы лечения ГБ, в том числе новые схемы неоадьювантной химиотерапии.

Методология и методы исследования

Проведенное проспективное, контролируемое, рандомизированное, открытое, исследование является самостоятельной научно-исследовательской работой, методология которой базируется на совокупности лабораторных, инструментальных, статистических методов и современным представлениям о центральной роли *Wnt*-сигнального пути в биологии стволовых клеток и ключевой роли ОСК в патогенезе ГБ. Центральным тезисом работы является стратегически важная роль β -катенина в механизмах фенотипической пластичности ОК и способности клофазимина подавлять биологическую активность β -катенина, что сопровождается усилением цитотоксического и цитостатического действия лекарственных препаратов в отношении ОСК. В работе использована комбинация методов воздействия на внутриклеточные механизмы сигнального пути *Wnt* с иммунотерапией, дестабилизирующей взаимодействие ОСК с микроокружением, что повышает эффективность лекарственной терапии. Исследование одобрено этическим комитетом ДВФУ (протокол № 8 от 08.06.2023 г.).

Положения, выносимые на защиту

1. Клофазимин обладает высоким противоопухолевым потенциалом;
2. Клофазимин увеличивает эффективность антиглиоминой химиотерапии;
3. β -катенин является важнейшей мишенью для регуляции ОСК;
4. Комбинация клофазимины с иммунотерапией сопровождается развитием аддитивного эффекта.

Степень достоверности и апробация работы

Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации. Достоверность полученных результатов и выводов основывается на достаточном объеме выборки и статистической обработке с расчетом стандартного отклонения и критерия достоверности, использовании современных методов исследования, корректном анализе полученных данных. Материалы работы доложены на 5 региональных и международных конференциях и конгрессах. По результатам диссертации опубликовано 5 статей в научных журналах, входящих в список ВАК России, реферируемых базами данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы – материалы и методы, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов и заключения. Работа включает 7 таблиц и 41 рисунков. Список литературы содержит 245 источников.

Благодарности. Выражаем благодарность профессору университета Женевы (Швейцария) Владимиру Леонидовичу Катанаеву за оригинальные идеи относительно клофазимины; профессору Хотимченко Юрию Степановичу и главному врачу медицинского комплекса ДВФУ Олегу Игоревичу Паку за финансовую помощь.

ГЛАВА 1 ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛОФАЗИМИНА И ГЛИОБЛАСТОМА (Обзор литературы)

1.1 Современное состояние проблемы

Глиобластома (ГБ) – первичная глиальная опухоль астроцитарного ряда, IV степени злокачественности [15, 148], по классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ). По отношению к социально значимым видам рака распространенность ГБ сравнительно не велика, в Северной Америке, странах Европы и Центральной Азии она варьирует от 3 до 6 случаев на 100 тыс. человек [163]. Распространенность ГБ в России составляет 6 случаев на 100 тыс. человек, при этом около 400 случаев ежегодно регистрируется на Дальнем Востоке до четверти из которых выявляются в Приморском крае [12, 13].

Абсолютное большинство случаев ГБ спорадические, среди факторов риска описан нейрофиброматоз первого и второго типа, белая раса и мужской пол, действие ионизирующего излучения и проживание в высоких широтах. Опухоль встречается практически во всех возрастных группах, но чаще выявляется во второй половине жизни [80] у мужчин так называемого «не испанского» типа.

В большинстве случаев ГБ имеет супратенториальную локализацию [16, 150], что позволяет опухоли длительное время, не оказывая значимого влияния на внутричерепную ликвородинамику. Однако опухоль сдавливает мозг и нарушает мозговое кровообращение, в этой связи возникновение симптомов практически всегда означает декомпенсацию процесса [14], который несет прямую угрозу жизни. Опухоль диагностируется на основании данных магнитно-резонансной томографии [31, 154], показанием к которой является цефалгический синдром, вызванный стойким повышением внутричерепного давления, очаговые и общемозговые (рвота, тошнота) неврологические синдромы, эпилептические припадки [66] либо когнитивные расстройства различной степени тяжести [150].

Хирургическая операция является методом выбора в лечении больных ГБ [15, 235]. Операция обеспечивает одномоментную элиминацию большого числа ОК, снижает внутричерепное давление, устраняет сдавление мозга и улучшает

общее состояние больного [3, 148]. Хирургическое лечение рекомендовано практически всем больным с опухолями головного мозга [8, 16], независимо от их гистологических параметров новообразования, но его возможности довольно ограничены. Тяжесть состояния пациента, функциональный статус ниже 70 по шкале Карновского, субтенториальная, таламическая, мультифокальная или бигемисферная локализация опухоли очень часто исключают возможность хирургического лечения без прямого риска для жизни и служат аргументом для отказа в операции [46, 150, 209] больным с впервые выявленной ГБ. Более того, инфильтрация ткани мозга ОК даже при использовании самых современных хирургических технологий не позволяет радикально удалить опухоль без причинения больному тяжелого неврологического ущерба [3, 15, 193].

Эффективность циторедукции существенно возрастает при комбинации операции с облучением [5, 28, 199]. Лучевая терапия повреждает ДНК, индуцирует процессы состаривания клеток ГБ и убивает ОК [154]. Применяется интраоперационное облучение [187, 233] и дистанционная γ -терапия [130], которая может дополняться брахитерапией [46], протонной [211] и нейтрон-захватной терапией [152]. Продолжительность жизни больного ГБ коррелирует с дозой полученной радиации, достигающей 60 Грей и более [126, 199], однако эскалация дозы [130] сопровождается лучевыми некрозами мозга, нарушением мозгового кровообращения, реактивным глиозом, склерозом, формированием кист и развитием психоорганического синдрома.

В абсолютном большинстве случаев несмотря на усилия врачей опухоль рецидивирует через 4-8 месяцев после удаления, при этом до 30% больных оперируются повторно [68, 225], что улучшает их общее состояние и качество жизни [19], снижает зависимость от кортикостероидов, улучшает эффекты адьювантной химиотерапии (ХТ).

Повторная операция требует особого мастерства, поскольку жидкостно-кистозные полости, возникающие после лучевой терапии, создают ложное представление о необходимом объеме резекции, что требует тщательного планирования операции с привязкой к четким анатомическим ориентирам -

борозды, желудочки, границы твердой мозговой оболочки, что не всегда возможно [235]. Отчасти именно по этой причине третья операция выполняется менее чем 10% больных, реоперированных по поводу прогрессирования или рецидива ГБ, и только 2% больных выполняется три и более повторных операций [183].

ХТ рекомендована всем больным ГБ [10]. Без преувеличения, это основной метод уничтожения ОК, который применяется в комбинации с облучением при лечении впервые выявленной ГБ, для пролонгации ремиссии после ХЛТ и для продления жизни больных при рецидиве опухоли [5, 28, 226]. Средством выбора является цитостатический противоопухолевый лекарственный препарат алкилирующего действия – темозоломид (ТМЗ), производное тетрамина. Высокая цитотоксическая активность ТМЗ в отношении клеток инвазивных глиом и карцином центральной нервной системы позволил назвать [154, 171] современный этап развития нейроонкологии «темозоломидной эрой».

ТМЗ проходит через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), хорошо проникает в спинномозговую жидкость, попадая в кровоток подвергается химическому превращению в монометилтриазеноимидазолкарбоксамид, действие которого обусловлено алкилированием гуанина в положении O6 и N7 с последующим запуском механизма аберрантного восстановления метилового остатка. Больным рекомендован прием ТМЗ в дозе 75 мг/м² на фоне лучевой терапии, 6-8 последующих циклов ТМЗ с увеличением дозы до 150-200 мг/м² и даже до 400 мг/м². Максимальная переносимая доза на один цикл лечения – 1000 мг/м². ТМЗ используются как в качестве монотерапии, так и в комбинации с ломустином [104] и ингибитором активности фактора роста эндотелия кровеносных сосудов – бевацизумабом [109, 243].

Ломустин – противоопухолевое средство алкилирующего действия, производное нитрозомочевины, как правило, препарат второй линии ХТ. Помимо алкилирования ДНК его противоопухолевое действие достигается угнетением ферментов репарации генома, повреждением ДНК-матрицы, торможением ряда ключевых ферментативных процессов в поздней фазе G1 и ранней S-фазе жизненного цикла ОК [104]. Рекомендуемая доза ломустина у взрослых составляет

130 мг/м² при однократном приеме внутрь каждые 6 недель, суммарная доза за все курсы лечения не должна превышать 1000 мг/м². Как и в случае с ТМЗ дальнейшие дозы ломустина подбираются в зависимости от эффективности лечения и гематологического ответа больного.

Попытки усиления противоопухолевой эффективности лекарственной терапии при комбинации ТМЗ с олапарибом – ингибитором репарации ДНК [113, 167] и вориноставом – антагонистом эпигенетических механизмов реставрации генома [52, 166] не принесли результата. Прокарбазин, винкристин, паклитаксел, препараты платины и другие цитостатики не имеют значимых преимуществ перед ТМЗ [185] или ломустином, их применение ухудшает гематологический статус, усиливает токсичность и не продлевает жизнь больных [75, 160, 239]. Широко используемый в последние годы метод терапии переменным магнитным полем расширяет возможности ХТ [139, 202], однако не обеспечивает стратегических преимуществ.

Итак, существующая стратегия лечения ГБ обеспечивает среднюю выживаемость больных 15 мес, при средней стоимости лечения 62,6 тыс. долларов США [96]. Основной вклад в стоимость лечения вносит именно ХТ, эффективность которой довольно низкая несмотря на огромный арсенал противоопухолевых средств. Безусловно, возможности ХТ ограничены селективной проницаемостью ГЭБ [199], но попытки введения лекарств в постэктомическое ложе ГБ, интратекальное и внутривентрикулярное введение химиопрепаратов, упаковка в нанокapsулы и адресная доставка цитостатиков в мозг с использованием моноклональных антител пока не принесла желаемого эффекта [76], что принято объяснять высокой фенотипической пластичностью ОК [22, 228, 29].

1.2 Пластичность опухолевых клеток и резистентность к лечению

Традиционно, под пластичностью подразумевают способность ОК переходить в недифференцированное состояние под влиянием деструктивных внешних воздействий, например, ХТ [165]. Такая постановка вопроса стала возможна в результате работы группы экспертов ВОЗ, который в классификации

опухолей головного мозга, принятой в 1979 г., отнесли к IV категории злокачественности все быстрорастущие новообразования – низкодифференцированные глиомы, медуллобастомы и некоторые другие первичные опухоли, признаком которых было быстрое инрастание анаплазии в ответ на усиление гипоксии, облучения или действие фармакологических препаратов. Такой подход позволил отчасти пренебречь гистологической структурой ряда неоплазий и сделал пластичность системообразующим понятием, характеризующим первичные опухоли мозга высокой степени злокачественности, главным представителем которых является ГБ.

Важнейший шаг в понимании механизмов пластичности ГБ был сделан *Roel Verhaak* [210], который описал ряд молекулярных фенотипов ГБ, среди которых пронеуральный, нейральный, классический и мезенхимальный, каждый из которых обладает потенциально разной чувствительностью к действию лекарственных средств. Систематика, предложенная *Roel Verhaak*, подверглась жесткой критике. Например, *Qianghu Wang* отверг существование описанного *Roel Verhaak* нейрального субтипа ГБ, а наличие других субтипов объяснил различием в профилях экспрессии генов, обусловленным иммуномодулирующим влиянием микроооружения на ОК.

Последующие работы [198, 218] подтвердили справедливость утверждений *Qianghu Wang*, уложив вышеописанные фенотипы в линейку единого процесса прогрессирующей анаплазии, ведущего к появлению агрессивного фенотипа ОК, который характеризуется высокой гетерогенностью молекулярно – генетических ландшафтов. Тем не менее, ОК соответствующие описанному *Roel Verhaak* пронеуральному субтипу оказались наиболее пролиферативно-активными, ОК классического субтипа сочетали хорошую репродуктивную активность с выраженной подвижностью, а ОК мезенхимального субтипа обладали высокой устойчивостью к ХТ и низкой степенью метилирования ДНК, что предопределило основной тренд развития проблемы, сместив акценты в область эпигенетики.

Основываясь на результатах эпигенетических исследований, *Cameron Brennan* [57] описано шесть классов метилирования ДНК в клетках ГБ, причем наивысший статус метилирования присвоен *idh*-мутантным опухолям, как самым дифференцированным и наименее пластичным. В результате *idh*-мутации в ОК образуется избыток 2-гидроксиглутарата, что сопровождается гиперметилированием промоторных областей гена *mgmt* (*O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*), обеспечивающего прямую репарацию ДНК [20, 158]. Снижение степени метилирования генома делает ОК более пластичными [86]. В свете этой логики в 2016 году ВОЗ выбрала *idh*-мутацию в качестве главного критерия систематизации глиом, выделив *idh*-дикий и мутантный типы ГБ [148], а также обозначив некоторую «транзитную» категорию ГБ с неопределенным статусом *idh*-мутации.

Теоретически, клетки *idh*-дикой ГБ обладают большей репликативной свободой и способны использовать широкий арсенал механизмов репарации однонитевых и двунитевых разрывов ДНК, включая гомологичную рекомбинацию и негомологичное соединение концов [54, 84, 90, 158]. Примечательно, что в последствии *idh*-дикий тип ГБ по признаку метилирования генома был разделен еще семь на классов [65], что позволило *Cyril Nefitel*, основываясь на идеях *Qianghu Wang* [165], описать четыре типа фенотипических состояний собственных клеткам ГБ: подобное нейральным и олигодендроглиальным прогениторным клеткам, астроцитоподобное и мезенхимальноподобное состояние, каждое из которых характеризуется уникальным профилем экспрессии генов [9, 82, 83, 217], что является результатом иммуномодулирующего влияния микроокружения на опухолевые стволовые клетки [87, 92, 93, 184], играющие главную роль в иерархии клеток ГБ.

1.3 Опухолевые стволовые клетки и химиотерапия

Принято считать, что клетки этого типа описаны в 1997 году, *Bonnet & Dick* при изучении иерархической структуры клеточной популяции острой миелоидной лейкемии [56]. Между тем указания на присутствие среди клеток рака желудка, молочной железы и других агрессивных опухолей небольшой популяции неопластических элементов с эмбриональными характеристиками встречаются еще в 1877 г., в работах *Юлиуса Фридриха Конгейма*, ученика *Рудольфа Вирхова* [212].

Допустимо утверждать, что ОСК – это трансформированные потомки нейральных стволовых клеток (НСК), населяющих субвентрикулярную зону и другие герминативные центры мозга человека. На это указывает идентичность более 60% белков протеома НСК и ОСК [59, 61], сложные атрактивно-пермиссивные взаимоотношения между клетками данных типов [64], присутствие среди микроокружения ОСК клонов астроцитарных и олигодендроглиальных прогениторов, транскриптомно-сходных с НСК мозга больного [79]; существование на всех стадиях глиоматоза популяции НСК-подобных элементов, несущих те же мутации, что и дифференцированные ОК [180, 220].

Нормальные НСК и ОСК сходны по ряду иммуноцитохимических маркеров клеточной поверхности, среди которых антиген CD133 (проминин-1) принято считать главным маркером стволовых клеток ГБ [32, 159, 220]. Однако кроме НСК этот гликопротеин присутствует в гемопоэтических стволовых клетках (ГСК), эндотелиальных прогениторных клетках, а также в почках, трахее, слюнных и молочных железах, плаценте, пищеварительном тракте, яичках и других нормальных клетках, и тканях [163].

Роль антигена CD133⁺ в неопластическом процессе в полной мере не изучена, но его прямое отношение к раку совершенно очевидно. Этот маркер присутствует в ОСК рака легких [244], колоректальной карциномы [172] и рака молочной железы [102]. ОСК иммунофенотипа CD133⁺ занимают наивысшее положение в иерархии клеток ГБ [94], обладают туморогенностью и высокой пролиферативной активностью. Однако наличие дифференцированных не туморогенных CD133⁺

клеток, прогениторно-подобных CD133⁺ клеток с ограниченным пролиферативным потенциалом и опухолевых, негативных в отношении этого маркера ОСК [50], иммунопозитивных в отношении CD56, SOX2, SOX9, CD15 [133, 200], A2B5 и других антигенов [94] позволяет утверждать, что феномен ОСК напрямую не связан с ОК какого-то одного иммунофенотипа.

Такая постановка вопроса проливает свет на причины безуспешности всех попыток повысить эффективность ХТ инвазивных глиом при комбинации TMZ или ломустина с моноклональными антителами против разных антигенов ОСК, в частности против антигена CD133 [18, 50, 104]. Вероятно, на начальном этапе опухолевого процесса, мутации, формирующие первичную стволовую линию, происходят именно в CD133⁺ НСК, обладающих самой высокой скоростью пролиферации среди всех клеток нервной системы. Пролиферация мутантных клеток приводит к увеличению объема клеточной массы, конкуренции за кислород и запуску механизмов, ведущих к появлению новых поколений CD133 – негативных ОСК, способных [24, 221] переключаться между анаэробным и аэробным метаболизмом, регулировать уровень утилизации липидов и глутамина, пролиферировать или пребывать в состоянии покоя, что позволяет адаптироваться к влиянию локальной микросреды.

В пользу этого утверждения указывают факты: пролиферирующие ОСК характеризуются амплификацией генов семейства циклинзависимых киназ, участвующих в смене фаз клеточного цикла, регулирующих транскрипцию и процессинг мРНК [221], обладают гликолитическим типом метаболизма и низким уровнем утилизации липидов, преимущественно локализованы в периваскулярных нишах; в свою очередь, ОСК находящимися в состоянии пролиферативного покоя, характеризующиеся мутацией гена *nfl* и другими признаками так называемого мезенхимального фенотипа, способными переключаться между гликолизом и аэробным дыханием и обладающими высоким уровнем метаболизма липидов, как правило, эти ОК выделяют из гипоксических зон и областей некроза [226], а также из опухолевой ткани рецидивирующей опухоли, характеризующейся высоким

уровнем гипоксии [145], подвергшейся воздействию ХЛТ [86, 239,241] и антиангиогенной терапии [112].

Итак, ключевые свойства ОСК непосредственно не связаны с каким-то определенным иммунофенотипом, их функциональная активность этого типа клеток определяется микроокружением, активизирующим в них ряд стратегически важных молекулярных механизмов, среди которых главную роль играет канонический сигнальный путь – *Wnt* [73, 110].

1.4 *Wnt*-сигнальный путь и микроокружение ОСК

Канонический сигнальный путь *Wnt* – важнейший внутриклеточный сигнальный путь, регулирующий дифференцировку стволовых клеток [39] и обеспечивающий баланс между симметричным и асимметричным делениями ОСК, что предопределяет агрессивность ГБ [177]. Центральным звеном этого механизма является β -катенин, который и в отсутствие специфического сигнала связывается с особым мультибелковым «деструктирующим комплексом», представленным белками APC, AXIN 1/2, SK1 и gsk-3 β . Активированный «деструктирующим комплексом» протеинкиназа gsk-3 β фосфорилирует β -катенин, который теряет функциональную активность и подвергается разрушению в протеасоме [39].

Сигнальный путь Wnt/ β катенин активируется одним из 19 белков – wnt1, wnt2, wnt2B, wnt3, wnt3A, wnt4, wnt5A, wnt5B, wnt6, wnt7A, wnt7B, wnt8A, wnt8B, wnt9A, wnt9B, wnt10A, wnt10B, wnt11, wnt16, секретируемых клетками микроокружения ОК и взаимодействующих с рецепторами семейства frizzled и lpr4/5 на поверхности ОСК, что при участии белка disheveled запускает каскад межбелковых взаимодействий, ведущий к блокаде «деструктирующего комплекса», накоплению β -катенина в цитоплазме ОСК, который входит в ядро, активирует Т-клеточный фактор (tcf) и запускает процессы экспрессии генов плюрипотентности [181] и пролиферации, среди которых *c-myc*, *cycD*, *wispl*, *ppar* γ и др.

Мутации гена *relp1* – потенциального коактиватора канонического wnt-сигнального пути [189], встречаются у большинства больных ГБ, гена *fat1* –

негативного регулятора *wnt* сигнализации выявляются реже – только у 57% пациентов, а гена *apc* только в 14,5% случаев [202, 163, 85, 195, 153, 115, 194, 146, 34], мутации других компонентов еще более редки [163]. Между тем высокое содержание β -катенина одна из главных характеристик CD133⁺ ОСК [85], указывает на участие иных, главным образом, эпигенетических механизмов, ведущих к его накоплению в клетках этого типа [195].

В качестве одного из таких механизмов описана активация сигнального пути PI3K-АКТ-mTOR [153], через который возможна как стимуляция *pi3k* [236], так и непосредственная активация внутриклеточного акт, который напрямую фосфорилирует *gsk-3 β* и увеличивает содержание β -катенина [175]. В свою очередь, mTor формирует два мультибелковых комплекса: mTorc1 и mTorc 2 антагонистически регулирующих активность друг-друга: первый – снижает [115], второй – увеличивает [194] содержание β -катенина в ОСК.

Увеличение содержания β -катенина активирует теломеразы, что ведет к удлинению теломер, иммортализации, стабилизации генома и обеспечивает выживание ОСК при ХТ [34, 146]. Содержание β -катенина в ОСК увеличивают семафорины – особый класс сигнальных белков, продуцируемых нейробластами и нейронами [100]. Синтез β -катенина в ОСК индуцирует TGF β , секретируемый ОК и клетками иммуносупрессивной микроглии [162]. Через свои сигнальные пути SMAD и DAXX этот цитокин активирует ось PI3K/АКТ/mTOR [205], что ведет к накоплению β -катенина в ОСК и указывает на стратегически важную роль микроокружения в регуляции ОСК.

β -катенин является одним из наиболее значимых регуляторов репродуктивной активности ОСК, при этом основным регулятором внутриклеточного содержания β -катенина в ОСК является локальное микроокружение. Микроокружение регулирует ОСК путем запуска двух разновекторных процессов – аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [73, 88]. Воспалительное микроокружение запускает микро и макроаутофагию, разрушающую внутриклеточные белки [240], обеспечивая энергетически независимую утилизацию β -катенина, критически снижая

активность ОСК и дестабилизирует взаимоотношения с внеклеточным матриксом, что позволяет ОСК мигрировать, пережить гипоксию, метаболический ацидоз и химиолучевую терапию.

Наоборот, иммуносупрессивное микроокружение [155], продуцирует *wnt3a*, *wnt5a*-лиганды, активирующие в ОСК сигнальный путь *Wnt*, одним из таргетных генов которого является *wisp1* [203], белковый продукт которого, усиливает синтез остальных *Wnt*-лигандов, а также IL-10 и IL-35, что подавляет аутофагию, ведет к увеличению содержания β -катенина и усилению взаимодействия с внеклеточным матриксом. В свою очередь, активация акт, опосредованная $\alpha\beta1$ и другими компонентами сигнального пути интегринов [47, 48], активирует продукцию *wnt*-лигандов, иммуносупрессивных цитокинов, programmed cell death (PD)-1 и cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 [203], что создает «аутокринную петлю» ведущую к усилению иммуносупрессии, формированию ниши и пролиферации ОСК [168].

В свете сказанного, феноменальная пластичность клеток ГБ обусловлена влиянием иммуносупрессивного микроокружения, способствующего увеличению содержания β -катенина в ОК, что обеспечивает переход от программы выживания к пролиферации ОСК, что ведет к рецидиву опухоли. Предприняты многочисленные попытки к регуляции этих процессов с использованием таргетной терапии.

1.5 Таргетная терапия и пластичность ОСК

Дифференциально активированные сигнальные пути различаются для пронеурального или пролиферативного и мезенхимального типов ОСК [209]. В первом случае, главную роль играет сигнальный путь тирозинкиназного (TRK) β -рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGF); во втором случае, сигнальные пути TGF- β , NF- κ B и гликолиза. Эти молекулярные механизмы в фокусе пристального внимания фармакологов [33], но успехи пока не очевидны.

TRK-рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGF) стал одной из основных целей для подавления пролиферации ОСК. Однако представитель нового

класса таргетных цитостатиков, ингибитор TRK-рецепторов PDGF-иматиниб провалил испытания у больных ГБ [190]. Мультикиназный ингибитор сорафениб было ограничено эффективен [127] лишь при условии адресной доставки в опухоль и только в сочетании с терапией переменным электромагнитным полем. Сунитиниб [37] был неэффективен у больных ГБ.

Попытки подавления пролиферации ОСК через TRK-сигнальный домен рецептора EGFR (эпидермального фактора роста) у больных ГБ провалились. Пептидная вакцина риндопепимут, направленная против антигена EGFRvIII не оправдала возложенных ожиданий [179] ни в качестве монотерапии, ни в комбинации с ТМЗ и бевацизумабом. Депатуксизумаб – моноклональное антитело против EGFR и нагруженное цитостатиком, показало скромные результаты, как в комбинации с ТМЗ [169], так и без таковой [131].

Онартузумаб – моноклональное антитело, направленное против TRK-рецептора фактора роста гепатоцитов (HGF) не показал результатов у больных ГБ в комбинации с ТМЗ и бевацизумабом [71]. Мультикиназный ингибитор кабозантиниб, в числе прочих механизмов блокирующий HGF сигнализацию был не эффективен у больных ГБ [72]. Только ингибитор TRK-рецептора фактора роста эндотелия кровеносных сосудов (VEGF) – бевацизумаб [243] в комбинации с ТМЗ увеличивает продолжительность жизни больных ГБ на 4-6 мес, что является подлинным достижением таргетной терапии.

Недостаточная эффективность ингибиторов TRK – рецептора породила множество попыток воздействия на нижележащие звенья сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. Бупарлисиб-ингибитор PI3K-киназы не показал никаких преимуществ по сравнению с монотерапией ТМЗ [222], карбоплатином и ломустинном [185]. Ингибиторы AKT-киназы (перифозин [117]) и mTOR-киназы (темсиролимус) не оправдали ожиданий, как в комбинации с ТМЗ, так и без таковой [192].

Мутация BRAF-V600E встречается у 20% опухолей и включает замену валина-600 на глутаминовую кислоту, перманентно активирует сигнальный путь

RAS/RAF/MEK/ERK. Однако ингибиторы мутантной протеинкиназы RAF – сорафениб [127] и вемурафениб [144] не показали результатов у больных ГБ.

Попытки воздействия на ОСК путем подавления процесса эпителиально – мезенхимального перехода (ЭМП) тоже оказались неэффективны. Ингибиторы трансформирующего фактора роста β -важнейшего индуктора ЭМП – трабедерсен [55] и галунисертиб [98, 223] не привели к увеличению выживаемости больных не в качестве монотерапии, ни в комбинации с ТМЗ, прокарбазином, ломустинном и винкристином. Предположения о возможности фармакологической регуляции ОСК через сигнальную ось PI3K/AKT/NF- κ B пока тоже не имели значимого успеха [107]. Имеются сообщения об апоптозе клеток ГБ путем активации сигналинга NF- κ B при стимуляции паттерн-распознающих рецепторов ОК препаратами двухцепочечной ДНК [138], но пока для лечения ГБ такой способ не применялся.

Итак, попытки регуляции ОСК с помощью таргетной терапии оказались практически не эффективны, однако определенные перспективы могут быть связаны с подавлением сигнального пути *Wnt*/ β -катенин.

1.6 Ингибиторы активности β -катенина и клофазимин

β -катенин является центральным фактором, обеспечивающим переход ОСК от состояния выживания к пролиферации. Стратегия противодействия этому переходу может строиться [132] на угнетении связи *wnt*-лиганда с рецепторным комплексом *frizzled*, подавлении антагонистов комплекса разрушения β -катенина, блокировании взаимодействия между β -катенином и *tcf/lef*. Большинство ингибиторов *Wnt*-сигнального пути пока не прошли клинические испытания, в этой связи основной интерес представляют перепрофилируемые лекарственные средства.

Wnt-ингибирующая активность описана у ряда препаратов из группы нестероидных противовоспалительных средств. Аспирин – один из самых распространенных препаратов данной группы, фармакологическое действие аспирина обусловлено ингибированием ферментов группы циклооксигеназ, что снижает уровень β -катенина в ОК, подавляет экспрессию таргетных генов *wnt*,

усиливает цитотоксическую активность ТМЗ и бевацизумаба [164], препятствует развитию колоректального рака и ряда *Wnt*-зависимых новообразований.

Препарат из группы нестероидных противовоспалительных средств-целекоксиб [118] реактивирует $gsk-3\beta$, устраняет эффекты активации «комплекса деградации β -катенина», угнетает TCF, в дозе 1200-1600 мг/день, подавляет циклооксигеназу 2 и карбоангидразу, что ухудшает процессы адаптации ОК к гипоксии [232] и усиливает цитотоксическую эффективность ТМЗ. В свете сказанного прием целекоксиба до операции и до окончания курса химиолучевой терапии [232] является вмешательством с низким риском и разумным основанием, однако способность целекоксиба подавлять агрегацию тромбоцитов в сочетании с гематологической токсичностью ТМЗ вызывает некоторую настороженность относительно таких утверждений.

Способность угнетать внутриклеточный сигнальный путь *Wnt*/ β -катенин отмечена и у других препаратов данной группы. Индометацин – производное индолуксусной кислоты, ингибитор циклооксигеназы 2, нарушает образование комплекса β -катенин/TCF с ДНК и препятствует экспрессии генов [170]. Сулиндак – нестероидный противовоспалительный препарат из группы производных уксусной кислот [40] усиливает деградацию β -катенина и препятствует его транслокации в ядро, что угнетает экспрессию генов-мишеней *wnt* в ОК.

Несмотря на очевидный антиглиомный потенциал данные о влиянии ингибиторов циклооксигеназ на ОСК практически отсутствуют. Нельзя исключить, что подавление ферментов группы циклооксигеназ [176] может угнетать синтез *wnt*-лигандов М2-поляризованной микроглией и другими клетками, формирующими микроокружение ОСК [53]. Однако способность подавлять снижать активность *Wnt*-сигнального пути в ОК характерна не только для этой группы препаратов.

Антибиотик тигециклин стимулирует экспрессию гена *axin1* и снижает уровень β -катенина в ОК [136]. Противопаразитарный препарат никлозамид вызывает деградацию белка *Irf6*, снижает содержание β -катенина в ядре и ингибирует активность факторов TCF/LEF [224]. Пирвиния памоат регулирует

экспрессию гена *mgmt* в клетках ГБ, реактивирует $gsk-3\beta$ и увеличивает чувствительность клеток ГБ к ТМЗ [135]. Ивермектин связывается с белком *telo2*, регулирующим активность $\rho 3k$, и снижает содержание β -катенина в ОК [147].

Особый интерес представляет лекарственный препарат из группы риминофеназинов – клофазимин (N,5-бис-(4-Хлорфенил)-3,5-дигидро-3-[(1-метилэтил)имино]-2-феназинамин), синтезированный *Vincent Barry* в 1957 году. Изначально клофазимин (КФЗ) применялся как антимикобактериальное средство, обладающее доказанной бактерицидной активностью в отношении бациллы Хансена. КФЗ подавляет рост микобактерий, способствует образованию активных форм кислорода, взаимодействует с фосфолипидами клеточных мембран, нарушает ионное равновесие и энергетический метаболизм бактериальной клетки [99]. Противовоспалительные свойства в сочетании со способностью индуцировать высвобождение простагландинов и угнетать фосфолипазу А₂, сделали возможным его применение в комплексном лечении узловатой лепрозной эритемы [99].

Противоопухолевые свойства КФЗ в отношении трижды-негативного рака молочной железы, что связывают подавлением экспрессии генов сигнального пути – *Wnt*, снижение уровня цитоплазматического β -катенина, а также запуском апоптоза в связи с арестом клеточного цикла в фазе G₂/M-фазы в ОК [36]. Противоопухолевая активность КФЗ в отношении ОК различных линий колоректальной аденокарциномы и рака яичников IC₅₀ препарата варьирует в пределах от 2-10 мкмоль/л, при этом отношении различных линий ГБ человека этот показатель составляет 20-40 мкмоль/л, что может быть связано как с *Wnt*-ингибирующей активностью, так и с другими метаболическими эффектами препарата [227].

КФЗ частично проникает через неповрежденный ГЭБ в спинномозговую жидкость, однако будучи липофильным веществом, препарат хорошо кумулируется в жировой ткани, накапливается в моноцитах и захватывается макрофагами [123]. Фагоцитоз кристаллов КФЗ не сопровождается явными токсическими проявлениями [206], при этом захваченный моноцитами КФЗ, накапливается в легких, печени и селезенке [234] и частично в костном мозге.

Подобные аргументы свидетельствуют о хороших перспективах КФЗ в качестве средства для доставки в опухоль с использованием транспортных возможностей моноклеарных клеток, составляющих значительную часть микроокружения ОСК [92].

Допустимо предположить, что необходимость специального транспорта через неповрежденный ГЭБ снижает антиглиомный потенциал препарата. Однако антиглиомный *Wnt*-ингибирующий эффект описан у производных вальпроевой кислоты, нейролептиков фенотиозинового ряда, оланзапина, амисульпирида и других препаратов [201], прекрасно проходящих через ГЭБ. Тем не менее, с 2005 г. более 100 исследований по комбинации ХТ терапии с разными лекарственными препаратами полностью провалились. Причина такой ситуации в значительной степени связана микроокружением ОСК, которое является важнейшим из факторов снижения антиглиомного потенциала лекарственных препаратов. Подобная постановка вопроса позволяет усомниться в возможности получения какого-то эффекта от таргетной терапии без его коррекции микроокружения ОСК, однако выработка практических подходов к решению этой проблемы требует переосмысления ряда ее важных теоретических аспектов.

1.7 Микроокружение ОСК и клетки костного мозга

До середины XX-го века микроокружение клеток глиом ассоциировали только с резидентными макрофагами нервной системы. Считалось, что мозг – иммунопривелигированный орган и его микроэкологические константы обеспечиваются микроглией, которая в онтогенезе происходит из клеток эмбрионального желточного мешка и после закрытия ГЭБ не взаимодействует с иммунной системой [67]. Однако множество данных свидетельствует об обратном.

Доказано [142, 125], что микроглиоциты могут выходить в глубокие шейные лимфоузлы и взаимодействовать с Т и В-лимфоцитами. Каждый Т-лимфоцит может распознавать сотни фрагментов одного антигена, представляемого на мембране антигенпрезентирующей клетки вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости I и II класса. При этом В-клетки могут связывать

интактные антигены с их нативной структурой, что указывает на активное информационное взаимодействие между клетками костного мозга и микроглией. Одновременно, иммунциты, через кровеносное русло опухоли, сосудистые сплетения, микроканалы и синусы черепа, цереброспинальную и интерстициальную жидкости способны проникать в мозг [106] и убивать клетки, содержащие представленный антиген. Подобные факты указывает на более важную роль иммунной системы в формировании микроокружения ОСК.

Экспериментальные исследования последних десяти лет расширили представление об участии иммунцитов в патогенезе ГБ. Развитие опухоли в мозге сопровождается миграцией и хоумингом клеток красного костного мозга в неопластический очаг [79], чему в значительной степени способствует повреждение ГЭБ, вызванное процессами опухолевого ангиогенеза. Описано множество факторов, привлекающих клетки костного мозга в опухоль, среди которых, традиционно, особо выделяют фактор стромальных клеток (SDF)1 или CXCL12 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12) – хемокин подсемейства CXС, который связывается с рецептором CXCR4 на мембране CD 45+ клеток костного мозга [95, 134, 219]. Накопление клеток костного мозга в неопластическом очаге оказывает непосредственное влияние на течение опухолевого процесса [25], однако вектор этого влияния зависит от состояния иммунцитов.

Принципиально важен тот факт, что клетки костного мозга больного ГБ обладают так называемым «истощенным фенотипом» [30, 51, 81], который характеризуется снижением эффекторных функций и способности к самообновлению, устойчивой экспрессией ингибирующих рецепторов и состоянием транскрипции, отличным от состояния функционально активных эффекторных иммунных клеток. Вероятно, истощение служит механизмом, защищающим иммунные клетки от гибели при гиперстимуляции антигенами ОК. Допустимо предположить, что высокая скорость пролиферации и динамичная смена спектра антигенов клеток ГБ является одним из факторов агрессии, перегружающих и инактивирующих иммунную систему.

Помимо динамической перегрузки антигенами истощение иммунных клеток связано с продукцией ОК лигандов рецептора программируемой клеточной смерти PD-L - 1 и 2, гликопротеина цитотоксических Т-лимфоцитов 4, (CTLA-4) и других белков, угнетающих рецепторы активности Т – клеток [51]. Однако эффективность применения нового класса препаратов, блокирующих связывание PD-лигандов с рецепторами Т-клеток -ниволумаба, ипилимумаба и некоторых других ингибиторов иммунного чек-пойнта, в комплексном лечении ГБ довольно невысока [42, 44, 143, 230], что указывает на еще более глубокие причины феномена истощения иммуноцитов, в первую очередь, связанные с использованием кортикостероидов и ХЛТ.

Глюкокортикостероиды, используемые для борьбы с отеком мозга [78], резко угнетают пролиферацию лимфоцитов, подавляют миграцию и взаимодействие макрофагов с Т- и В-лимфоцитами, тормозят высвобождение интерферона γ из макрофагов и снижением образования антител [66], их применение ведет к развитию истощенного фенотипа иммуноцитов [174] и снижает общую выживаемость [128].

Важным фактором формирования истощенного фенотипа иммуноцитов является ХЛТ. Существуют данные, за 30 фракций γ -терапии лимфоциты накапливают среднюю дозу облучения в 2-3 Грей, а количество CD4⁺ клеток в организме снижается вдвое и остается низким в течение более года [236]. Более высокие дозы облучения, используемые в процессе лечения при применении методов радиохирургии, сопровождаются развитием «эффекта свидетеля» в костном мозге и вызывают гибель большого числа иммунных клеток. В свою очередь цитостатики угнетают кроветворение и иммунопоз, способствуя развитию клинически значимой тромбоцитопении и лейкопении, которую принято считать единственным критерием [129], ограничивающим эскалацию дозы ТМЗ. Примечательно, что снижение числа нейтрофилов не менее чем на 40% ниже нормы является критерием удовлетворительного прогноза при *idh* – дикой ГБ [188], при этом достижение 3-4 степени нейтропении оцениваются как прогностически

позитивный результат ХТ, при этом при числе нейтрофилов менее $1 \cdot 10^9/\text{л}$ целесообразно уменьшение дозы в ходе следующего курса лечения.

В свете сказанного, накопление в опухоли иммуноцитов «истощенного фенотипа» на фоне интенсивного синтеза ОК иммуносупрессивных цитокинов и PD-лигандов, способствует усилению ангиогенеза и формирует особую иммуносупрессивную микросреду, трансформирующую их в направлении M2-поляризованных макрофагов [241] продуцирующих многочисленные wnt-лиганды. При этом M2-микроглия, иммунореактивная в отношении антигенов Arg1, FIZZI, Chi3I3 и CD206, [215] также синтезирует TGF β и IL10 и другие противовоспалительные цитокины, что замыкает «секреторную петлю», ведущую к усилению продукции wnt-белков, накоплению β -катенина в ОСК, росту резистентности к ТМЗ и реализации смертоносного потенциала этого типа клеток. Теоретически, нарушение сложившейся системы взаимодействия ОСК и клеток костного мозга может существенно повысить эффективность применения *Wnt*-ингибиторов и других таргетных средств. Одним из самых доступных способов достижения этой цели является комбинация лекарственных препаратов и методов иммунотерапии (ИТ).

1.8 Принципы иммунофармакотерапии глиом

Методы фармакологической регуляции микроокружения ОСК еще не прошли этап эксперимента. Однозначного мнения относительно подходов к этому вопросу к настоящему времени нет. Основной группой лекарственных средств, потенциально тестируемых для коррекции микроокружения ОСК являются уже упомянутые ингибиторы иммунного чек-пойнта [44], которые *David Reardon* предложено комбинировать с бевацизумабом и ТМЗ [43, 178]. Гипотетически, такая комбинация может быть эффективна в связке с антагонистами TGF β или антагонистом CXCR4 хемокинового рецептора – плериксафором, который показал снижение содержания макрофагов истощенного фенотипа в ткани ГБ [38, 204].

Количество подобных комбинаций довольно велико, однако системным решением в отношении коррекции микроокружения ОСК является клеточная ИТ в

комбинации с ингибиторами сигнального пути – *Wnt*. Конечно, эффективность существующих методов ИТ пока недостаточно велика, что напрямую связано с использованием иммуноцитов «истощенного фенотипа», рекрутируемых в кровотоки при введении гранулоцитарного (Г-КСФ) или гранулоцитарно – макрофагального (ГМ-КСФ) колониестимулирующих факторов. Во-первых, такая стимуляция усиливает иммуносупрессию [119], во-вторых, полученные таким образом мононуклеарные CD45⁺ клетки, при стимуляции воспалительными цитокинами и иммунологическим адьювантом демонстрируют высокий уровень энергии, что сильно снижает их возможный терапевтический потенциал. В контексте этого утверждения показательны результаты эксперимента, введение Г-КСФ экспериментальным животным с глиальной опухолью мозга после ХТ, что сопровождалось обогащением опухоли маркерами, характерными для M2-поляризованной микроглии, а последующая иммуностимуляция с использованием бактериального липополисахарида и ИФН- γ способствовала слабой воспалительной активации макрофагов [241].

Существенно больший антиглиомный эффект достигается при трансплантации в организм животных иммуноцитов здорового сиблинга [63], что прямо указывает на важнейшую проблему недостаточной эффективности ИТ глиом. Использование иммуноцитов здорового родственника или лучше аутологических клеток, заготовленных задолго до болезни, открыло бы качественно новые горизонты комплексного лечения ГБ, однако современные алгоритмы адаптивной и активной ИТ строятся на основе собственных клеток пациента.

Адаптивная ИТ предполагает использование мононуклеарных CD45⁺ клеток, с последующей сепарацией Т-лимфоцитов *ex vivo* их дополнительной активацией интерлейкином 2 [35] и таргетированием против ключевых антигенов клеток ГБ, среди которых IL13R α 2, HER2 и EGFRvIII, synNotch и т.д [70, 103]. Минусы такой терапии довольно очевидны; введение больному Г-КСФ и стимуляция антигенами *bacillus Calmette-Guérin*, *Staphylococcus aureus* или другой пиогенной микрофлоры может вести к усилению отека мозга, что опасно для жизни.

Альтернативный вариант подразумевает манипуляцию с иммунными клетками больного *ex vivo*, например, генетическую модификацию Т-клеток, снабжаемых Chimeric Antigen Receptors (CAR), где участки антиген-распознающих доменов, состоящие из моноклональных антител, соединяются с участками доменов внутриклеточной сигнализации Т-лимфоцитов [27, 58, 151, 157].

Важной проблемой CAR-технологий является отсутствие идеальных антигенов-мишеней, которые являлись бы не только опухолеспецифичными, но и гомогенно распределенными в опухоли. Не менее важной проблемой, лимитирующей потенциал адаптивной ИТ, является ГЭБ. Предпринимаются попытки решения этой проблемы путем персонализированного подбора антигенов-мишеней на основе данных геномно-протеомного анализа, комбинации CAR-Т клеток с особо тропным к ОК пептидом – хлоротоксином, обнаруженный в яде скорпиона *Leiurus quinquestriatus* [213] или онколитическими аденовирусами [214]. Большой интерес представляют попытки применения CAR-Т киллеров или CAR макрофагов [91], однако большинство этих технологий пока на стадии эксперимента.

В клинической нейроонкологической практике более востребована активная ИТ, которая предполагает выработку противоопухолевого иммунитета путем вакцинации [6, 62] опухолево-клеточными вакцинами (ОКВ) либо инкубацию иммунных клеток с лизатами ОК *ex vivo* с последующим возвращением больному в форме дендритноклеточной вакцины (ДКВ). Применение ОКВ имеет множество преимуществ: среди которых, систематическая вакцинация активизирует CD8-лимфоциты, активизирует процессы презентации антигенов макрофагами, синтез провоспалительных цитокинов и модификацию микроокружения опухоли [45], что увеличивает выживаемость больных как с впервые выявленной, так и рецидивирующей ГБ [140].

В качестве антигенов для создания ОКВ используются аутологические или аллогенные ОК, что позволяет стимулировать иммунный ответ с учетом гетерогенности популяции неопластических клеток [122], что особенно актуально для ГБ. В свете данной логики ОКВ должна включать комбинацию убитых,

например, путем многократной заморозки и разморозки нативных ОК с клетками, полученными путем последовательной эскалации дозы облучения *in vitro*, а также дериваты ОСК других пациентов. Такой подход позволяет не только уничтожить ОК, но и может существенно повысить противоопухолевый иммунитет и обеспечит формированием локальных перекрестных внутриопухолевых взаимодействий между CD4⁺ лимфоцитами и другими Т-клетками [216], что ведет к усилению продукции провоспалительных цитокинов, модифицирующих микроокружение ОСК. Наконец, возможно создание ОКВ [237] на основе живых, генетически модифицированных ОК, продуцирующих ГМ-КСФ.

Антиген-специфические ОКВ, продуцирующие ГМ-КСФ, используются уже более 20 лет, но и их применение, в первую очередь, вскрывает проблему лейкопении и иммунодефицита. Общие недостатки использования ОКВ характерны для метода терапии ДКВ. Дендритные клетки – это профессиональные антигенпрезентирующие клетки с высокой функциональной пластичностью, которые происходят из ГСК и проявляют иммуностимулирующий или иммуносупрессивный потенциал в зависимости от последовательности и комбинации стимулов микроокружения. Технология приготовления ДКВ включает рекрутирование иммуноцитов в кровотоки, выделение фракции мононуклеарных клеток, содержащих достаточное число ГСК, стимуляцию *ex vivo* антигенами ОК в сочетании с IL-2 или IL4, размножение в присутствии провоспалительных цитокинов и возвращение больному [177]. Антигенами для создания ДКВ могут являться лизаты ОК, онкоспецифические белки, фрагменты ДНК и РНК [137].

Эффективность ДКВ пока недостаточно велика. Безусловно, есть сообщения об увеличении выживаемости отдельных больных ГБ более 23 мес. [141], однако общую ситуацию даже не изменила комбинация дендритноклеточных вакцин с ингибиторами иммунного чек-пойнта [245] и другими методами ИТ [156]. Терапия ДКВ приводит к общим иммуностимулирующим эффектам в виде усиления содержания иммуносупрессивных цитокинов и локальной инфильтрацией стромы опухоли иммуноцитами. Однако общей проблемой ДКВ является истощенный фенотип аутологических иммуноцитов, решение которой возможно только путем

создания таких вакцин на основе иммунцитов здорового сиблинга, либо генетически близкого донора, что может критически повысить эффективность подавления β -катенина в ОСК. Совершенно очевидно, что нейроонкология находится на грани мощного рывка, который неизбежно будет сделан путем комбинации таргетных средств с эффективной ИТ.

Итак, центральной проблемой лечения ГБ являются ОСК. Уничтожение этого типа ОК с использованием облучения и цитостатиков невозможно, что диктует необходимость корректировки существующей стратегии лечения ГБ. Многочисленные попытки решения этой проблемы с помощью таргетных средств пока тоже к успеху не привели, что принято объяснять пластичностью ОСК, при этом β -катенин – центральное звено в системе внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих пластичность этого типа клеток.

Регуляция уровня β -катенина в ОСК с использованием арсенала перепрофилируемых лекарственных средств [175] открывает широкие возможности контроля их репродуктивного потенциала. Лекарственный препарат КФЗ обладает способностью подавлять внутриклеточный сигнальный путь *Wnt*/ β -катенин, характеризуется хорошей переносимостью и демонстрирует противоопухолевую активность в отношении ОК ряда агрессивных карцином, при этом его антиглиомный потенциал фактически не изучен. Способность КФЗ к накоплению в моноцитах открывает широкие перспективы его адресной доставки в опухолевый очаг с учетом транспортного потенциала этого типа клеток.

Заслуживает особого внимания тот факт, что уровень β -катенина в ОСК напрямую возрастает под влиянием иммуносупрессивного микроокружения, в формировании которого основную роль играют микроглиоциты и моноциты истощенного фенотипа, обусловленного гиперстимуляцией опухолевыми антигенами, влиянием PD–лигандов, глюкокортикостероидов, облучением и ХТ. Использование иммунцитов истощенного фенотипа лимитирует потенциал всех лекарственных средств и технологий, поскольку добиться снижения уровня β -катенина без подавления продукции *Wnt*-лигандов локальным микроокружением ОСК практически невозможно.

Применение КФЗ и других перепрофилируемых лекарственных средств, обладающих доказанной *Wnt* ингибирующей активностью, может снизить уровень β -катенина в ОСК. В свою очередь, ИТ может скорректировать микроокружение ОСК и существенно повысить эффективность лекарственной терапии. Допустимо утверждать, что таргетная терапия должна применяться в связке с ИТ на основе иммуноцитов здорового гаплоидентичного донора.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы, использованные в работе

Стандартизованные клеточные линии

В работе использованы стандартизованные линии, представленные в таблице 1. Используемые линии ОК были получены от производителя, их характеристики соответствуют паспортным параметрам и подтверждены сертификатами соответствия ISO 9001, ISO 13485, ISO/IEC 17025 и ISO 17034. Транспортировка и хранение клеточных линий осуществлялись в соответствии с требованиями производителя компании ATCC (США). Клетки протестированы на контаминацию микоплазмой с помощью Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC® 30-1012K™). Использование клеточных линий человека и животных в экспериментальных исследованиях согласовано с Локальным этическим комитетом ДВФУ (протокол №8 от 08.06.2023 г.).

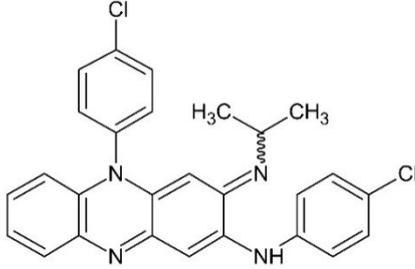
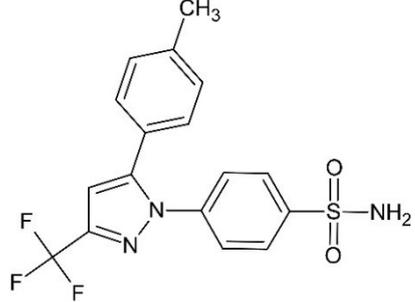
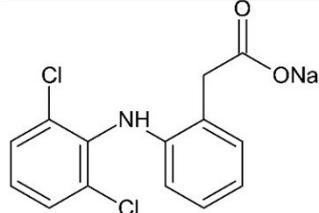
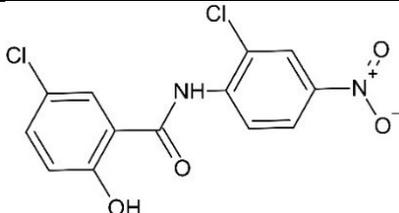
Таблица 1 – Используемые в работе клеточные линии согласно действующей номенклатуре «International Cell Line Authentication Committee»

Название линии, каталожный № ATCC®	Организм, источник	Ключевое свойство	IDH-статус	Заболевание
T98G (CRL1690™)	Человек, мозг	Адгезивная	IDH-дикий тип с низким уровнем метилирования MGMT	ГБ
U-87 MG (HTB-14™)	Человек, мозг	Адгезивная	IDH-дикий тип	ГБ
C6 (CCL107™)	Крыса, мозг	Адгезивная	IDH-дикий тип	ГБ

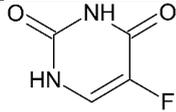
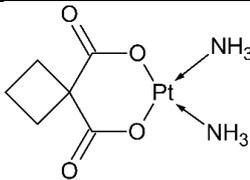
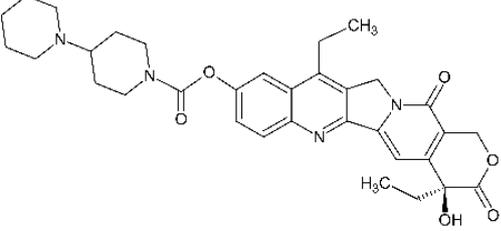
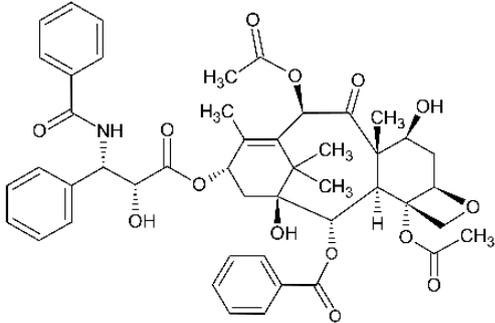
Лекарственные субстанции

В работе использованы лекарственные субстанции, представленные в таблице 2.

Таблица 2 – Используемые в работе лекарственные субстанции

Международное непатентованое название	Производитель, кат. №	Международное химическое название	Формула
Клофазимин	Merck 2030-63-9	N,5-Bis(4-chlorophenyl)-3,5-dihydro-3-(isopropylimino)phenazin-2-amine	
Целекоксиб	Merck 169590-42-5	4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide,	
Диклофенак натрия	Merck 15307-79-6	Diclofenac sodium salt, 2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]benzeneacetic acid sodium salt	
Никлозамид	Merck 50-65-7	Niclosamide, 2',5-Dichloro-4'-nitrosalicylanilide	
Темозоломид	Merck 85622-93-1	Temozolomide, 3,4-Dihydro-3-methyl-4-oxoimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazine-8-carboxamide, 3-Methyl-4-oxo-8-imidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazinecarboxamide, 4-Methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-triene-9-carboxamide, 8-Carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one	

Продолжение таблицы 2

5-фторурацил	Merck 68941-95-7	5-Fluorouracil-15N2	
Карбоплатин	Merck 41575-94-4	Diamine [1,1-Cyclobutane Dicarboxylate] platinum	
Иринотекан	Merck 100286-90-6	(S)-4,11-diethyl-3,4,12,14-tetrahydro-4-hydroxy-3,14-dioxo-1H-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-9-yl ester, CPT-11, [1,4'-Bipiperidine]-1'-carboxylic acid	
Паклитаксел	Merck 33069-62-4	[2aR[2a alpha,4beta,4a beta,6beta,9alpha(alphaR*,beta aS*),11 alpha,12alpha, 12a alpha, 12b alpha]]-beta-(Benzoylamino)-alpha-hydroxybenzenepropanoic acid 6,12b-bis(acetyloxy)-12-(benzoyloxy)-2a,3,4,4a,6,9,10,11,12,12a, 12b-dodecahydro-4,11-dihydroxy-4a,8,13,13-tetramethyl-5 -oxo-7,11-methano-1H-cyclodeca[3,4]benz[1,2-b]oxet-9-yl ether	

Материалы и реагенты для культуральных работ

Культуральная среда Игла модифицированная Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM, кат. № 21068028); культуральная среда RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, кат. № 51800019); бессывороточная среда «CellGroDC» (кат. № 20801-0500 «CellGenix», Германия); антибиотик-антимикотик 100X: 10000 уд.ед./мл пенициллин/стрептомицин, 25 мкг/мл фунгизона (кат. № 15240096); эмбриональная телячья сыворотка (Fetal Bovine Serum, FBS кат. № 16000044); Трипсин, модифицированный ЭДТА (0.25 % кат. № 25200056) –

реагенты производства компании Gibco (США). Рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, G-CSF (кат. № SRP3331, Merck, США); Интерлейкин 4 (кат. № I17003, Merck, США); DAPI (NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (кат. № R37606, Invitrogen, США); PBS (PhosphateBuffered Saline (10X), кат. № A1286301, Gibco, США); МТТ набор (MTT Cell proliferation assay kit, кат. № V13154, Invitrogen, США); раствор Хэнкса (Hank`S Balanced Salt Solution, HBSS, кат. № H6648 Merck, США).

Таблица 3 – Антитела, использованные первичные для проведения иммуноцито- и гистохимических исследований и иммуноблотинга

Антитело	Производитель	Разведение	Значение
CD133	Termo Fisher, США	1:100	Маркер ОСК глиобластомы
CD44	Termo Fisher, США	1:100	Маркер ОСК глиобластомы
CD68	Termo Fisher, США	1:100	Маркёр М1- макрофагов/микроглии
CD206	Termo Fisher, США	1:100	Маркёр М2- макрофагов/микроглии
CD45	Termo Fisher, США	1:100	Общелейкоцитарный антиген
Iba-1	Termo Fisher, США	1:500	Маркер микроглии
β-катенин	Cell Signaling Technology, США	1:1000	Ключевой белок <i>Wnt</i> -сигнального пути
PCNA	Termo Fisher, США	1:2000	Пролиферирующих клеток ядерный антиген
N-кадгерин	Cell Signaling Technology, США	1:200	Миграционный кадгерин
E- кадгерин	Cell Signaling Technology, США	1:500	Адгезионный кадгерин
Актин	Abcam, США	1:1000	Цитоплазматический белок
Гистон H3	Abcam, США	1:1000	Ядерный белок

В работе использованы видоспецифические вторичные антитела, конъюгированные с Alexa488 (anti-mouse, Novex; A11059, 1:500) и с Alexa633 (anti-rabbit, Novex; A21071, 1:500), ядра контрастировали DAPI (Molecular Probes; D1306). Контроль специфичности окрашивания проводили на препаратах без использования первичных антител.

Экспериментальные животные

В работе было использовано 150 половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой тела 180-220 г в начале эксперимента. Содержание и уход за животными осуществляли в соответствии с требованиями стандартов GLP, Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, директивой ЕС 2010/63 / EU по экспериментам на животных; руководством национального института здоровья США по уходу и использованию лабораторных животных. Все исследования на животных соответствовали рекомендациям ARRIVE и AVMA от 2013 г. Эксперимент *in vivo* одобрен Этическим комитетом ДВФУ (протокол № 8 от 08.06.2023 г.).

2.2 Методы исследования

Культивирование эукариотических клеток. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах в полной культуральной среде (ПКС), содержащей среду DMEM либо RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 100 Ед/мл, антибиотика-антимикотика 100X при 37°C (5% CO₂). Клетки культивировались при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) до достижения 80% конфлюэнтности монослоя. Адгезировавшие клетки снимали с помощью ферментативной диссоциации (0,05% trypsin-EDTA, 1:4 при 37°C, 10 мин.) и центрифугировали (120g, 4 мин), сливали надосадочную жидкость, добавляли свежей среды, ресуспендировали и после 3 пассажа использовали в эксперименте.

Получение клеток костного мозга

Согласно методике Ковиной М.В. (Kovina et al., 2019), животных умерщвляли и стерилизовали в течение 3-5 мин. в 70% этаноле. Бедренные кости перетирали с добавлением 5 мл HBSS с 10 Ед./мл гепарина. Полученную суспензию пропускали через 70 мкм фильтр, который затем промывали 2 мл буферного раствора. Два фильтрата объединяли и центрифугировали 5 мин. при 340g. Клетки ресуспендировали в 2 буфера и подсчитывали в камере Горяева. Культивирование клеток костного мозга проводили по стандартной методике.

Получение опухолевых клеточной вакцины

Получение ОКВ проведено по методике И.А. Балдуевой, состоящей из 6 последовательных циклов моментального замораживания $3 \cdot 10^7$ клеток глиомы С6 до -196°C и оттаивания до комнатной температуры в фосфатно-солевом буфере без криопротектора; осаждения клеточного детрита центрифугированием (10 мин, 3000 об./мин); фильтрации надосадочной фракции через миллипоровый фильтр (0,2 мкм); расфасовки опухолевого лизата в криопробирки и хранение при -20°C до использования.

Получение дендритноклеточной вакцины

Использован метод описанный И.А. Балдуевой с соавт. [4]. Использованы мононуклеарные клетки костного мозга животных – сиблингов, клетки в количестве $1 \cdot 10^6$ вносили в стерильные 15-мл центрифужные пробирки, разбавляли четырехкратным избытком неполной питательной среды RPMI-1640, ресуспендировали и культивировали в течение 2 ч (5% CO_2 , 98% влажность, 37°C). Неадгезивные клетки удаляли, прикрепившиеся клетки отмывали неполной питательной средой. Дифференцировку в незрелые ДК проводили в сбалансированной бессывороточной среде «CellGro DC», ГМ-КСФ (72 нг/мл) и ИЛ-4 (20 нг/мл) вносили на 1-й, 3-й и 5-й дни культивирования. На 7-е сутки вносили лизированные ОК в соотношении 1:3 с ДК и инкубировали 48 часов, осаждали центрифугированием, отмывали в 5 мл 0,9% раствора NaCl и производили подсчет живых клеток с помощью автоматического счетчика «Countess» и окраски трипановым синим (T8154, Merck, США). ДКВ вводили в центральную хвостовую вену в количестве 10^5 клеток на животное.

γ -Облучение крыс с глиомой С6

γ -облучение крыс с глиомой С6 проводили с помощью установки TrueBeam (Varian Medical Systems, США). Животных наркотизировали путем в/б введения смеси (содержащей 100 мкл Золетил/Рометар 1:4) и облучали в 4 Гр за 6 фракций.

Тест зарастания царапины

Клетки (10^4 клеток на лунку) высевали в 6-луночные планшеты (Greiner Bio-One; 662120), культивировали до формирования монослоя (24 часа), далее проводили замену ПКС на среду с тестируемыми препаратами. Далее в монослое наносили царапины (1 мм) и производили фотосъёмку одних и тех же участков через каждые 2 часа в течение 24-48 часов. Степень зарастания царапины ОК вычисляли как отношение площади царапины через 8, 12, 24, 48 ч к ее площади через 0 ч после нанесения.

Получение ОК с индуцированной химиорезистентностью

ОК культивировали в среде, содержащей ТМЗ 150 мкМоль/л в течение 72 часов. Мертвые клетки удаляли отмывкой средой после первого цикла обработки. Оставшиеся жизнеспособные клетки культивировали в свежей среде с добавлением 150 мкМоль/л ТМЗ в течении еще 72 ч. Через 72 ч мертвые клетки удаляли путем отмывания свежей средой, а оставшиеся жизнеспособные клетки оставляли для повторного роста еще на 72 ч. Для оценки жизнеспособности применяли МТТ тест.

МТТ-тест

Анализ жизнеспособности ОК до и после обработки тестируемыми веществами проводили с помощью МТТ теста с бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия в соответствии с протоколом производителя (Abscam, США). Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (IC_{50}), определили с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.

Метод тестирования лекарственных веществ *in vitro*

Клетки ($3 \cdot 10^4$) высевали в 24-луночные планшеты, культивировали в течение 24 ч (Greiner Bio-One Ltd.; 662160), затем ПКС меняли на новую с добавлением тестируемых веществ в концентрациях полумаксимального ингибирования и ТМЗ 5 мкМ. В качестве контроля использовали интактные ОК и фибробласты человека HDF (CRL2076™). Подсчет жизнеспособных клеток выполнялся автоматически с использованием системы Cell-IQ® MLF.

Проточная цитометрия

После стандартной пробоподготовки клетки обрабатывали моноклональными антителами против указанных антигенов (Таблица 3) и проводили анализ позитивных по маркерам клеток на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter). Для каждого образца анализировали не менее 10000 событий. Чтобы отличить одиночные клетки от агрегатов и удалить их из анализа, использовали сочетания пикового и интегрального сигнала флюоресценции DAPI. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «Kaluza Software, 10 UserNetworkPack» (FullVersion) и «ModFit TL» (Verity Software House). Результат выражали в виде процента позитивных по каждому маркеру ОК в образцах контрольных и химиорезистентных ОК.

Моделирование ГБ у крыс

Животных наркотизировали путем в/б введения 200 мкл смеси (тилетамин/золазепам 1:4 Virbac, Франция). ОК линии С6 ($0,3 \cdot 10^6$ в 5 мкл) имплантировали в область каудопутамена с помощью стереотаксического аппарата (Narishige, Япония) в соответствии со стереотаксическими координатами атласа крыс Swanson: Ap-1; Л 3,0; V 4,5, ТБС-2,4 мм. Клетки вводили шприцем Hamilton со скоростью 5 мкл/мин. Опухоль была подтверждена через 10 дней с помощью магнитно-резонансной томографии на аппарате «Bruker's PharmaScan®» (Массачусетс, США).

Нейровизуализационное исследование

МРТ головного мозга проводили с использованием МР-томографа «Bruker's PharmaScan®» (Массачусетс, США) под общим наркозом с применением специальной магнитной катушки для мелких лабораторных животных. Объем опухолевого узла определяли по формуле: $V=4/3\pi \cdot abc$, где a, b, c – полуоси эллипсоида. Находили срез с максимальной площадью узла опухоли, на котором определяли большую полуось (а) и малую полуось эллипсоида (б). Затем путем суммирования толщины фронтальных срезов на расстоянии от переднего до заднего полюса опухолевого узла находили переднезаднюю полуось (с) и производили вычисления объема опухоли.

Метод «открытое поле»

Тест выполняли по методике Морковина с соавторами [23], на 10 и 21 день эксперимента. Проводили оценку ориентировочно-исследовательской активности, исходя из числа пересеченных квадратов по периметру установки, числа заглядываний в норки, числа вертикальных стоек; эмоциональную реакцию оценивали по числу перемещений на квадраты в центре поля и времени нахождения в этих квадратах; о степени тревожности судили по частоте груминга. Результаты сравнивали до и после курса лечения и сопоставляли с данными контрольных (интактных) животных.

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование выполняли по стандартному протоколу [11]. Крыс глубоко наркотизировали и перфузировали трансаортально 4% ПФА. Серийные срезы мозга толщиной 7 мкм готовили на криостатном микротоме 60 (MicromHM 560 Thermo Scientific, США). Окрашивание срезов гематоксилин – эозином и 0,1% толуидиновым синим (Sigma-Aldrich, США) на 0,1 М ацетатном буфере pH 3,5 (FLUKA; 31048). В работе использованы первичные антитела указанные в таблице 3. Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена PI-1000 (anti-rabbit) и PI-2000 (antimouse), использовали в соответствии с инструкциями производителя (компании Vector Laboratories, США, 1:100). Специфичность окрашивания первичными антителами подтверждали, используя отрицательный контроль.

Для проведения иммуногистохимического окрашивания инкубировали в 3% растворе перекиси водорода, трехкратно промывали в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2) их обрабатывали в течение 60 мин. в 2% растворе БСА (Santa Cruz, SC-2323, США) и 0,25% Тритона X-100 (Gerbu, США). Инкубация срезов мозга с первичными антителами проводилась во влажной камере (4°C, 24 ч). После 3-кратной промывки срезы инкубировали в течение 60 мин. в растворе вторичных антител, меченных пероксидазой хрена. При проведении иммунопероксидазной реакции после отмывки вторичных антител препараты в течение 5-10 мин. обрабатывали хромогеном (Thermo Scientific, DAB Plus and Vector Laboratories,

Nova RED, США). Затем срезы отмывали 0,1 М фосфатным буфером (pH 7,2), обезвоживали и заключали в бальзам по стандартной методике (Dako Toluene-Free Mounting Medium (Dako, CS705, США). Препараты изучали с помощью микроскопа AxioScope A1 и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

Метод иммуноферментного анализа

Исследование ткани мозга крыс на содержание β -катенина (ab32572) проводили с применением набора Abcam (США). Материал замораживали в жидком азоте, гомогенизировали с использованием буферного раствора, содержащего 0,25 М сахарозы; 0,01 М Трис HCl; 0,001 М ЭДТА; 0,01 М HEPES (реагенты производства Merck, США). К тканевой вытяжке добавляли лизирующий буфер в концентрации 5 мл на 1 мг ткани, смесь инкубировали, центрифугировали и собирали супернатант. Содержание β -катенина оценивали с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit в соответствии с рекомендациями производителя, компании Thermo Fisher (США). Оптическую плотность определяли на микропланшетном спектрофотометре BioRad xMark при длине волны 450 нм. Результат по каждой пробе вычисляли по калибровочной кривой, усредняли показатели 6 параллельных проб и выражали результат в нг/мл.

Вестерн-блоттинг

Для лизиса клеток и экстракции общего белка использовали буфер RIPA (кат. № 89901, Thermo Fisher Scientific, Inc.), концентрацию общего белка определяли, используя набор Pierce™ BCA (кат. № 23227, Thermo Fisher Scientific, Inc.). Белки в лизатах ОК (50 мкг общего белка) разделяли с помощью 10% додецилсульфата натрия (SDS) методом SDS-PAGE по Лэммли, избыток SDS удаляли, используя комплект SDS-Out™ (кат. № 20308, Thermo Fisher Scientific, Inc.) Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с первичными кроличьими антителами: актин (Abcam, ab8227; 1:1000), гистон H3 (Abcam, ab1791, 1:1000) E-кадгерин (Cell Signaling Technology, 3195, 1:500), N-кадгерин (Cell Signaling Technology, 4061, 1:200), β -катенин (8480; Cell Signaling Technology, Inc, 1:1000).

В работе использованы вторичные козы антитела (Abcam, ab150077; 1:1000). Первичные антитела инкубировали в течение 12 ч при 4°C, а вторичное антитела инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Для усиления хемилюминесценции использовали набор Pierce™ ECL (кат. № 32209, Thermo Fisher Scientific, Inc.). Ядерные и цитоплазматические фракции общего белка разделяли с использованием реагента NE-PER (кат. № 78835, Thermo Fisher Scientific, Inc.). В работе использован автоматический иммунохимический анализатор Beckman Coulter (UniCel DxI 800).

ПЦР исследование

Для оценки уровня мРНК к β -катенину использовали ПЦР- анализ с обратной транскрипцией. Тотальную РНК экстрагировали из ОК линии U87 и T98G с использованием набора TRIzol™ Plus. Комплементарную ДНК получали из 1 мкг общей РНК из каждого образца с использованием SuperScript® VILO™ cDNA Master Mix. Для анализа комплементарной ПЦР использовали 6 нг комплементарной ДНК в конечном объеме 20 мкл. Использованы: прямой, 5'-ССТССАГГТГАСАГСААТСАГ-3' и обратный, 5'-GCCСТСТСАГСААСТ СТА САГ-3' праймеры β -катенина. Согласно методике (179), исследование включало начальную денатурацию (94°C, 5 мин), денатурацию (96°C, 15 сек.), отжиг и элонгацию (60°C, 1 мин, 40 циклов). Все реагенты использовали в соответствии с инструкцией производителя, компании Thermo Fisher Scientific, Inc. Образцы получали в трех экземплярах и подвергали статистической обработке.

Оценка выживаемости экспериментальных животных

Оценка выживаемости крыс с перевитой глиомой проводилась путем построения кривой Каплана-Майера.

Статистическая обработка

Полученные данные подвергали обработке с применением пакета прикладных программ «GraphPad Prism 4.0» (GraphPad Software, Inc, США). В работе применяли U-тест Манна-Уитни для малых групп. Результаты считались статистически значимыми при $U < U_{crit} = 46$ ($n = 15$) для $\alpha = 0,05$; и $U < U_{crit} = 51$ ($n = 15$) для $\alpha = 0,01$. Результаты исследования представлены как среднее

арифметическое \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Дисперсионный анализ проводился с применением F-теста для сравнения множественных данных ($n_1 = 270$, $m_1 = 6$ – для ИЦХ; $n_2 = 72$, $m_2 = 6$ – для вестерн блоттинга; $n_3 = 40$, $m_3 = 4$ – для ПЦР; $n_4 = 150$, $m_4 = 5$ – для эксперимента *in vivo*), после чего проводился парный post hoc t-test с поправкой Бонферрони ($\alpha = 0,05$) для избежания ошибки первого рода. Результаты считались статистически значимыми при значениях частоты ошибок по семейству $p < \alpha$. IC_{50} рассчитывалось с использованием модели нелинейной регрессии.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Иммуноцитохимическая характеристика клеток, используемых в эксперименте

3.1.1 Иммуноцитохимическая опухолевых клеток

Контрольные культуры ОК окрашивались антителами против ключевых маркеров опухолей нейроглиального ряда (Таблица 4).

Таблица 4 – Иммуноцитохимическая характеристика ОК, используемых в эксперименте

%	С6		U87MG		T98G	
	Контроль	Резист. ТМЗ	Контроль	Резист. ТМЗ	Контроль	Резист. ТМЗ
PCNA	54,2±2,3	13,7±1,5	45,7±3,5	18,3±1,1	50,7±5,3	20,5±2,2
CD133	4,2±1,5	12,7±2,8	4,1±1,8	15,5±4,2	90,2±8,5	92,9±1,4
CD44	25,6±3,5	57,1±4,8	35,9±3,96	63,2±5,7	52,9±6,3	71,3±5,2
GFAP	9,5±2,1	3,5±1,2	11,5±2,5	8,8±5,2	3,4±2,2	2,5±3,2
β-катенин	25,8±1,9	56,7±2,3	28,1±1,76	44,4±4,5	32,6±1,1	49,6±3,7*
Е-кадгерин	31,2±4,6	21,9±2,1	36,5±3,7	22,1±1,3	52,1±0,9	49,4±1,7
Н-кадгерин	17,9±1,3	35,8±3,5*	32,6±2,8	42,4±1,2	36,4±1,3	58,6±5,1*

Клетки, используемые в эксперименте, обладали высокой пролиферативной активностью, которая была максимальной в отношении клеток линии С6 (Таблица 4). При этом число ОК иммунореактивных в отношении ключевого маркера пронеурального типа ОСК – антигена CD133⁺ было сравнительно не велико, и не превышало 4% в отношении клеток С6 и U87MG. Клетки линии T98G характеризовались высоким содержанием клеток CD133⁺ иммунофенотипа.

Одновременно, число ОК экспрессирующих интегральный антиген CD 44, известный как рецептор гиалуроновой кислоты, часто используемый в качестве маркера мезенхимального фенотипа ОК, в контрольной культуре было довольно велико; так, содержание ОК фенотипа CD44⁺ в культуре линии С6 и U87MG составило 25,6±3,5 и 35,9±3,96%, максимальное содержание ОК фенотипа CD44⁺

было характерно для линии T98G, где эти клетки составляли более половины клеточной популяции – $52,9 \pm 6,3\%$.

В ходе иммуноцитохимического исследования до трети популяции контрольных ОК линии С6 и U87MG окрашивались антителами к β -катенину, и адгезионному Е-кадгерину, однако наибольшее число Е-кадгерин позитивных ОК было характерно для глиомы линии T98G (Таблица 4).

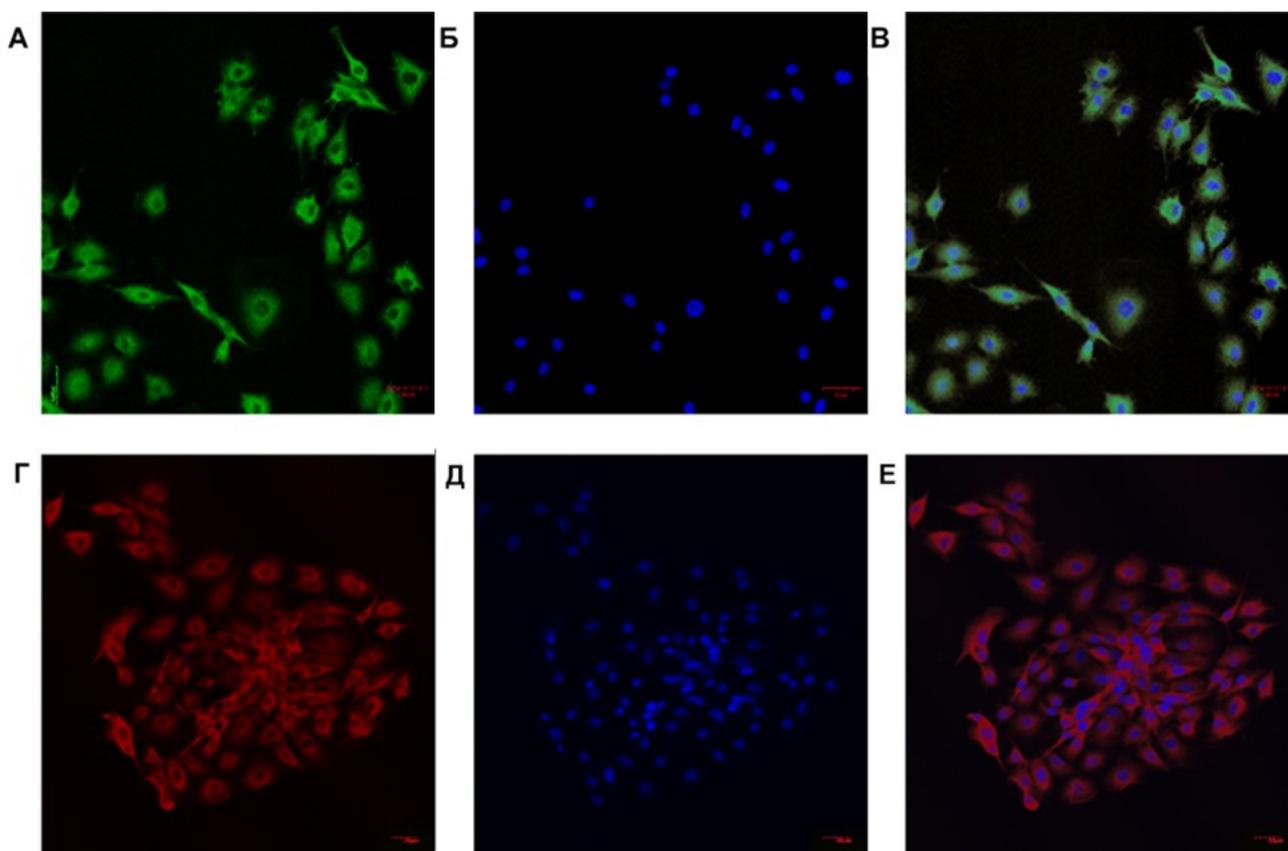


Рисунок 1 – Иммуноцитохимическая характеристика ОК линии С6: А. Окраска ОК антителами против антигена CD133; Б. окраска ядер DAPI; В. объединенное изображение; Г. Окраска ОК антителами против антигена CD 44; Д. окраска ядер DAPI; Е. объединенное изображение. Флуоресцентная лазерная микроскопия

Систематическая обработка TMZ приводила к снижению количества пролиферирующих клеток, что было особенно заметно для ОК линии С6, где количество PCNA-иммунореактивных клеток снижалось до $13,7 \pm 1,5\%$, что сопровождалось модификацией иммуноцитохимического профиля ОК. В культурах линии С6 и U87MG отмечалось некоторое увеличение числа элементов

CD133⁺ иммунофенотипа (Таблица 4), однако в культуре ОК линии T98G их число существенно не изменилось. Одновременно в культуре ОК линии C6 и U87 MG число ОК иммунореактивных в отношении антигена CD44 возросло до 56,7±2,3% и 63,2±5,7%, что практически вдвое больше по сравнению с контролем (Таблица 4), эта тенденция была отмечена и в культуре ОК линии T98G, где их число составило 71,3±5,2% от всей клеточной популяции.

Синхронно с увеличением содержания элементов мезенхимального CD44⁺ фенотипа в культуре ОК с индуцированной резистентностью к ТМЗ возросло число элементов окрашивающихся антителами к β – катенину и миграционному N-кадгерину и при одновременном снижении уровня адгезионного E-кадгерина. Наблюдаемые изменения подтверждались данными вестерн-блоттинга (Рисунок 2) и ПЦР – исследования (Рисунок 3).

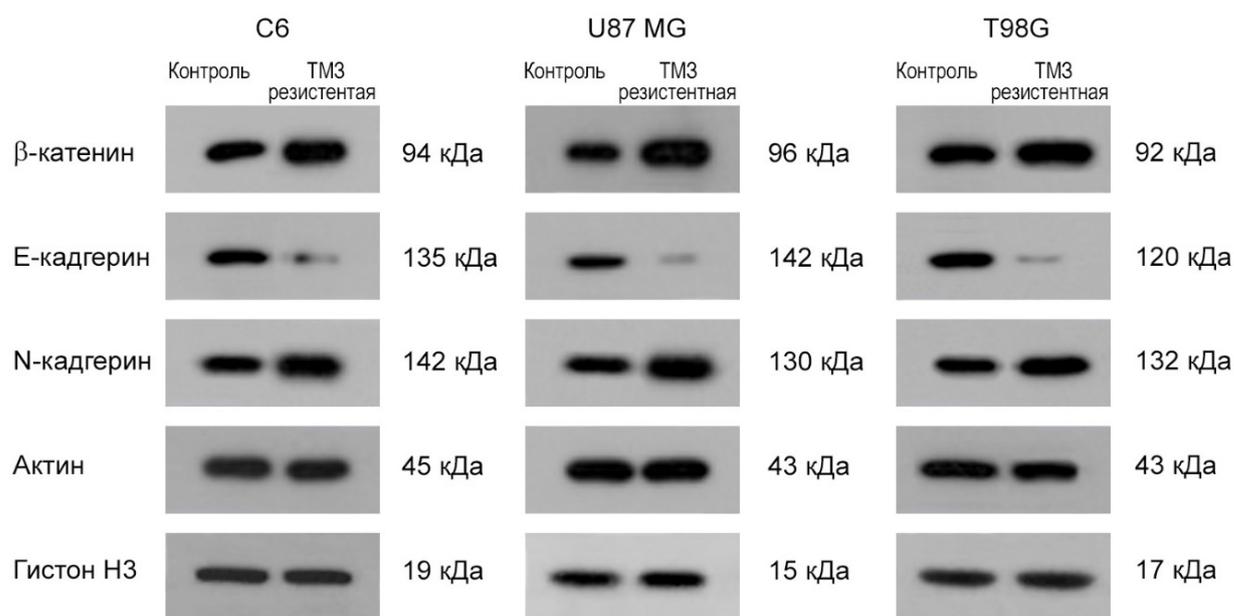


Рисунок 2 – Содержание β-катенина и белков эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевых клетках по данным вестерн-блоттинга. Цитоплазматический белок актин, и ядерный гистон H3 – контроль

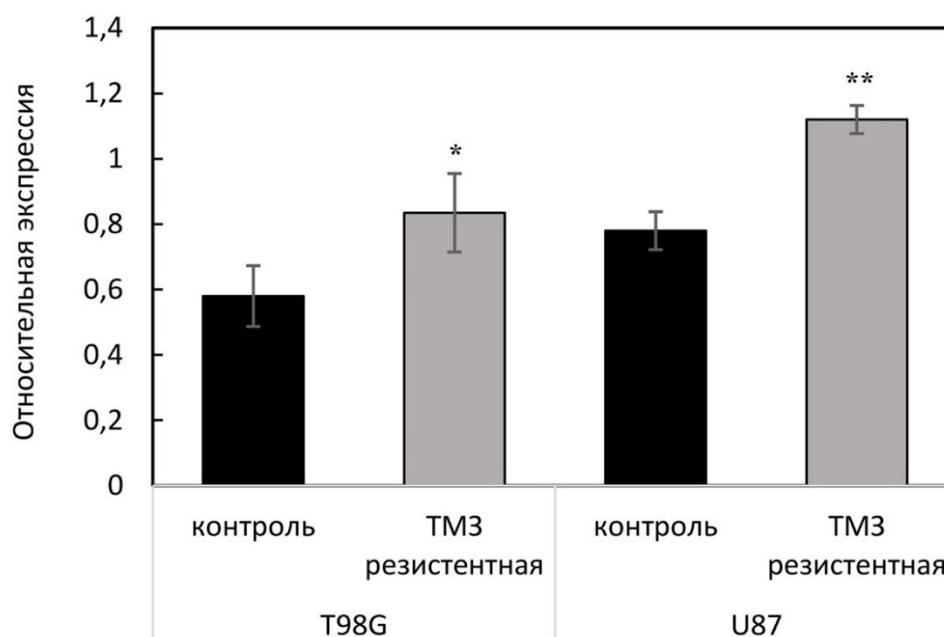


Рисунок 3 – Уровень мРНК β -катенина в ОК линии U87MG и T98G. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение в трех независимых исследованиях (*, ** различия достоверны $p < 0,05$)

Таким образом, с увеличением резистентности к ТМЗ пролиферативная активность ОК снижается, в составе клеточной популяции возрастает число элементов $CD44^+$ фенотипа, что сопровождается накоплением в ОК β -катенина и увеличением содержания миграционного N-кадгерина.

3.1.2 Иммуноцитохимическая характеристика клеток костного мозга крысы, использованных в эксперименте

Клетки, выделенные из костного мозга здоровых крыс, прикреплялись к поверхности планшета, выживали и пролиферировали, формируя скопления, представленные морфологическими элементами преимущественно округлой, и полигональной формы (рисунок 4, А и Б) на момент начала культивирования $43,3 \pm 3,3\%$ окрашивались антителами к антигену CD45.

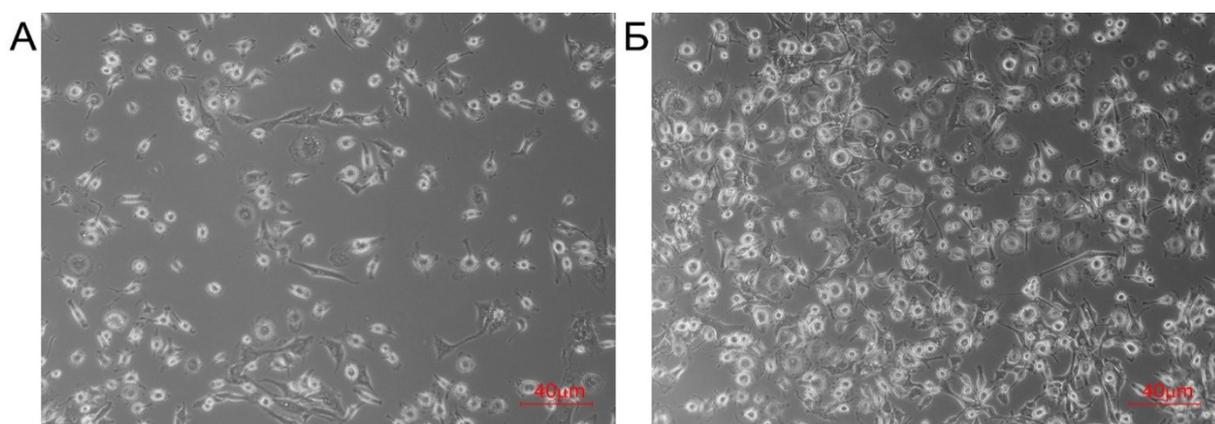


Рисунок 4 – Клетки костного мозга, световая микроскопия. А. 3 день культивирования; Б. 7 сутки культивирования

На 7 сутки культивирования в присутствии коктейля цитокинов, более $82,3 \pm 4,2\%$ клеток окрашивались антителами против общелейкоцитарного дифференцировочного антигена -CD45, локализованного преимущественно в цитоплазме (рисунок 5).

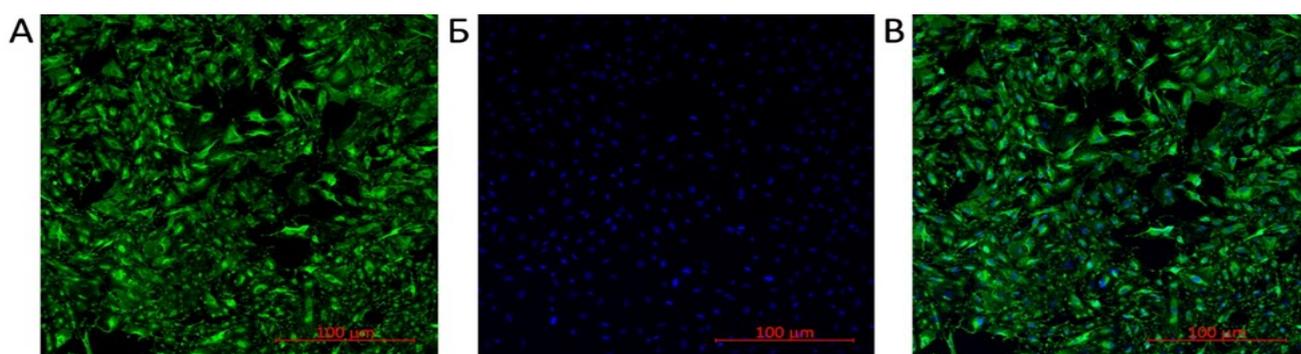


Рисунок 5 – Иммуноцитохимическая характеристика клеток костного мозга крысы, окраска антителами против: А. CD45; Б. DAPI; В. объединенные изображения для окрашивания с DAPI. Флуоресцентная лазерная микроскопия

На момент добавления лизатов ОК $13,4 \pm 3,2\%$ клеток окрашивалась антителами против антигена CD 68 – маркера макрофагов воспалительного типа и $11,5 \pm 4,3\%$ клеток окрашивалась против антигена CD80 – маркера дендритных клеток.

При приготовлении дендритно-клеточной вакцины (ДКВ) значительная часть адгезировавших $CD45^+$ клеток, культивируемых в присутствии лизатов ОК окрашивалась антителами против окрашивались антителами против антигена CD

68 ($65,4 \pm 3,2\%$) и CD 80 ($75,5 \pm 5,3\%$), что указывает на присутствие в составе клеточной популяции достаточного количества дендритных клеток (Рисунок 6).

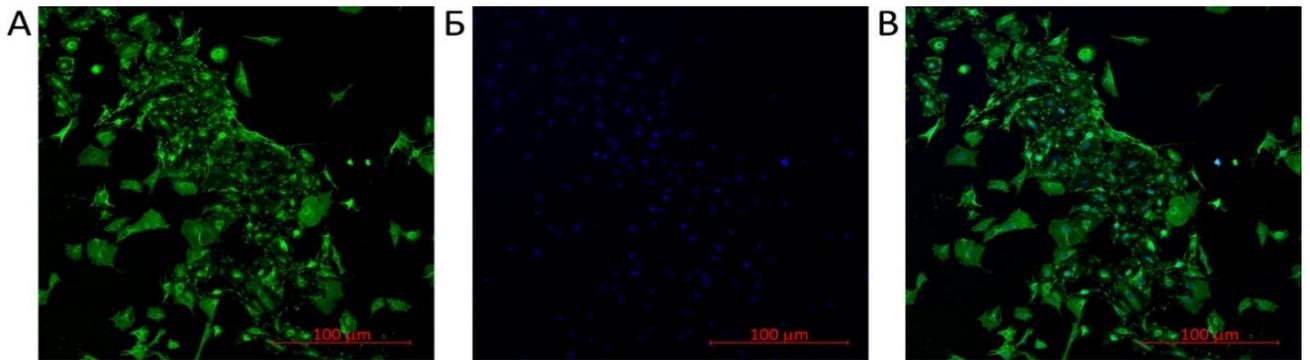


Рисунок 6 – Иммуноцитохимическая характеристика клеток костного мозга иммунизированной крысы, окраска антителами против: А. CD 80; Б. DAPI; В. объединенные изображения для окрашивания с DAPI. Флуоресцентная лазерная микроскопия

3.2. Влияние клофазимина на клетки глиобластомы *in vitro*

3.2.1 Влияние клофазимина на подвижность клеток ГБ в тесте зарастания царапины в клеточном монослое

В контрольной культуре (Рисунок 7) время зарастания царапины составило для ОК линии С6 – $61,4 \pm 3,2$ ч, для линии клеток линии U87MG – $55,3 \pm 3,3$ ч. и для T98G – $60,5 \pm 4,5$ ч. Под влиянием тестируемых препаратов подвижность ОК снижалась, что проявлялось увеличением времени зарастания царапины в клеточном монослое. Данный эффект был наиболее выражен у КФЗ, который в концентрации 10 мкмоль/л увеличивал время зарастания царапины в культуре клеток линии С6 до $79,2 \pm 4,5$ ч. (Рисунок 7 А). Наблюдаемый эффект усиливался с ростом концентрации КФЗ до 50 мкмоль/л, дальнейшее увеличение концентрации препарата сопровождалось развитием цитотоксического эффекта.

В культуре ОК линии U87MG (Рисунок 7 Б) сохранялась динамика, отмеченная при анализе культуры линии С6, при этом с ростом концентрации КФЗ 50 мкмоль/л подвижность ОК достоверно снижалась.

Важно, что в отношении клеток линии T98G (Рисунок 7 В) в диапазоне сравниваемых концентраций сохранялся цитостатический эффект КФЗ, который в концентрации 10 мкмоль/л обнаруживал достоверные отличия от интактного контроля и был сопоставим с целекоксибом. Дальнейшее увеличение дозы

целекоксиба сопровождалось усилением цитостатического эффекта, однако итоговое время зарастания царапины в клеточном монослое в культуре ОК, содержащих целекоксиб в концентрации 250 мкмоль/л, было сопоставимо с таковым в культуре, содержащей 50 мкмоль/л КФЗ.

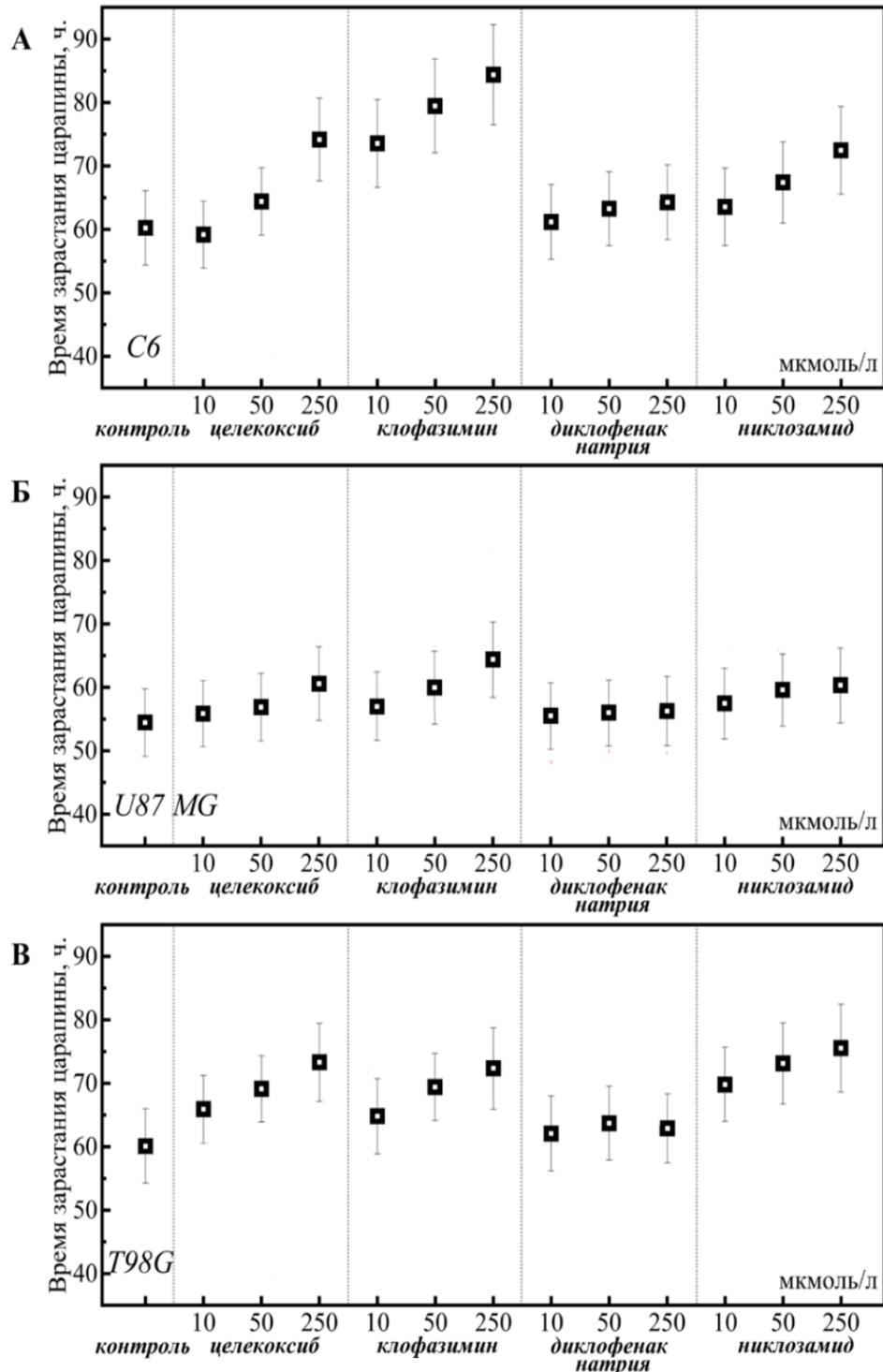


Рисунок 7 – Влияние перепрофилируемых лекарственных средств на подвижность ОК в тесте зарастания царапины в клеточном монослое: А. ОК линии С6; Б. ОК линии U87 MG; В. линии T-98G

3.2.2 Влияние клофазимина на подвижность фармакорезистентных клеток T98G в тесте застания царапины в клеточном монослое

В контрольной фармакорезистентной культуре T98G (Рисунок 8А) время застания царапины составило $85,25 \pm 5,3$ ч, фармакорезистентные ОК достоверно были менее подвижными. Под влиянием перепрофилируемых препаратов подвижность фармакорезистентных ОК снижалась более выражено по сравнению с интактной культурой, что проявлялось увеличением времени застания царапины в клеточном монослое. Данный эффект был наиболее выражен у КФЗ, который в концентрации 10 мкмоль/л увеличивал время застания царапины в культуре клеток до $120,45 \pm 13,7$ ч. Наблюдаемый эффект усиливался с ростом концентрации КФЗ до 50 мкмоль/л, дальнейшее увеличение концентрации препарата сопровождалось развитием цитотоксического эффекта.

При обработке ОК Wnt3A белком подвижность резко возрастала по сравнению с интактным контролем, время застания царапины составило $72,5 \pm 6,5$ ч против $137,5 \pm 4,0$ ч (Рисунок 8 Б). Клофазимин в концентрации 50 мкмоль/л существенно снижал подвижность фармакорезистентных ОК, данный параметр составил $196,4 \pm 14,5$ ч.

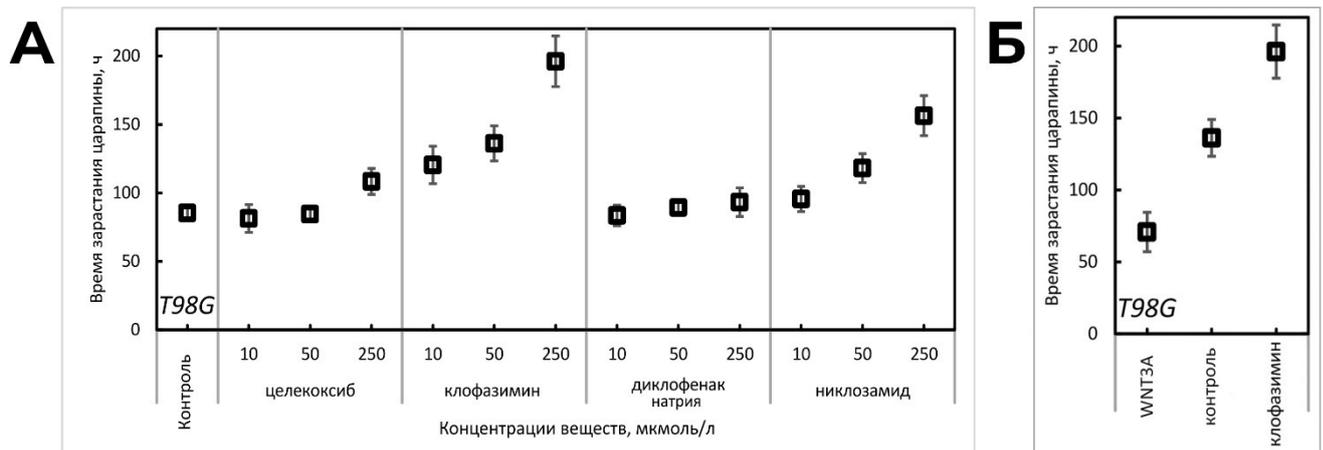


Рисунок 8 – Влияние перепрофилируемых лекарственных средств на подвижность ОК: А ОК линии T98G в тесте застания царапины в клеточном монослое; Б. при стимуляции Wnt3A белком

3.2.3 Цитотоксическое действие клофазимина на модели глиобластомы

Клофазимин обладал наибольшей антиглиомной активностью в линейке протестированных ЛС (Рисунок 9), в концентрации $37,6 \pm 3,2$ мкмоль/л этот препарат вызывал гибель более половины популяции клеток линии С6 за 24 ч наблюдений. IC_{50} целекоксиба для ОК линии С6 составила $48,4 \pm 3,9$ мкмоль/л. Цитотоксическое действие целекоксиба уступало клофазимину и было сопоставимо с никлозамидом, IC_{50} которого для линии С6 составило $53,4 \pm 4,7$ мкмоль/л. Антиглиомный эффект всех протестированных ЛС существенно превосходил диклофенак.

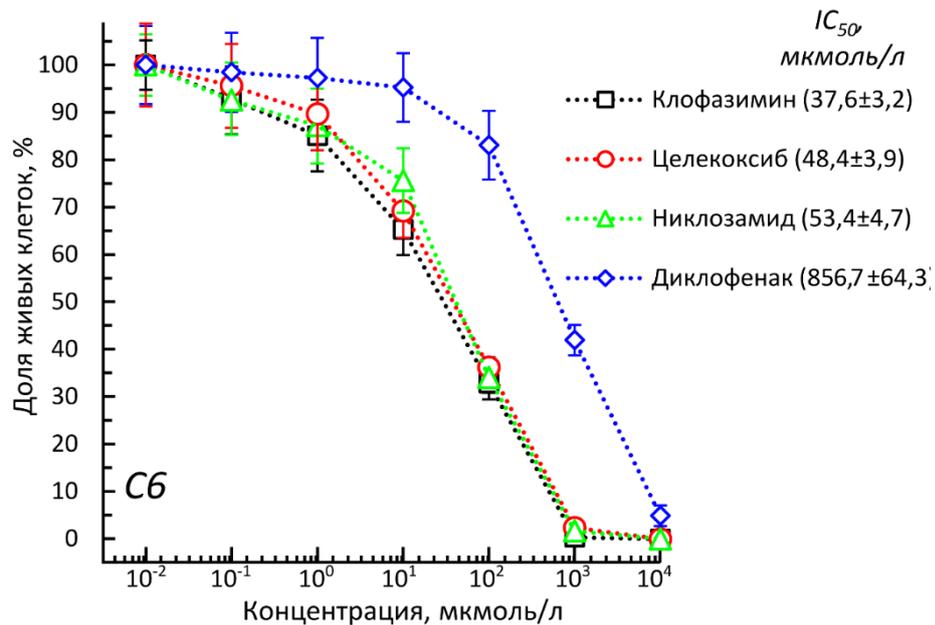


Рисунок 9 – Цитотоксическая активность ЛС в отношении ОК линии С6. По оси ОХ – концентрации ЛС, мкмоль/л, по оси ОУ – доля живых ОК, в % за 24 ч экспозиции

Антиглиомная активность клофазимина в отношении используемых в эксперименте клеток ГБ человека также была высокой (Рисунок 10), обнаруживая некоторые различия в диапазоне полуингибирующих доз.

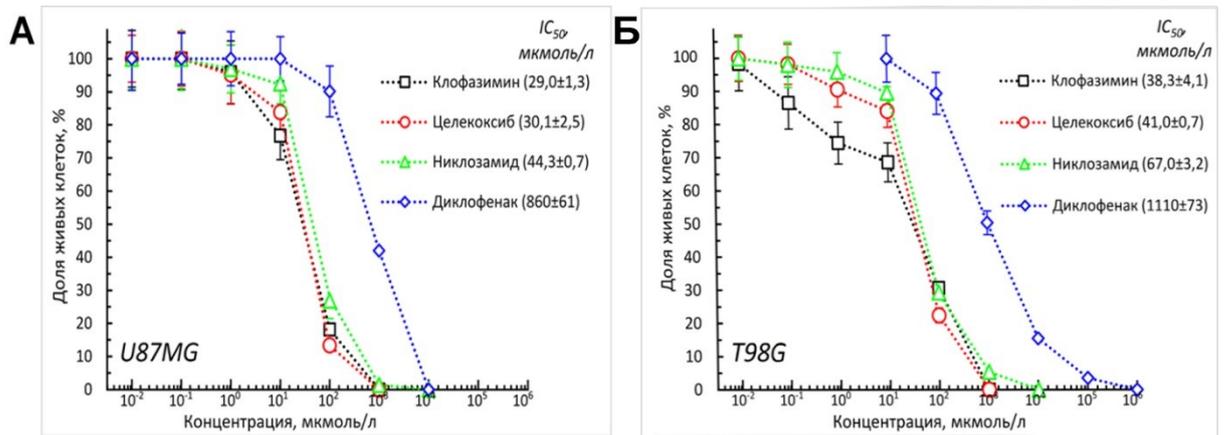


Рисунок 10 – Цитотоксическая активность ЛС в отношении ОК ГБ человека. А. линии U87MG; Б. T98G. По оси ОХ – концентрации ЛС, мкмоль/л, по оси ОУ – доля живых ОК, в % за 24 ч экспозиции

Клетки ГБ линии U87MG обладали довольно высокой чувствительностью к клофазимину (Рисунок 10А), которая, в диапазоне полуингибирующих концентраций, превосходила линию С6 и составляла IC_{50} 29,0±1,3 мкмоль/л. Подобная динамика была характерна для целекоксиба и никлозамида, IC_{50} этих препаратов для данной линии ОК составили 30,1±2,5 и 44,3±0,7 мкмоль/л, соответственно.

Цитотоксическая эффективность клофазимина в отношении клеток ГБ линии T98G была сопоставима с линией С6. После 24 ч наблюдения IC_{50} для ОК линии T98G составило 38,3±4,1 мкмоль/л. Целекоксиб и никлозамид в более высоких концентрациях сохраняли цитотоксический эффект (Рисунок 10Б), уступающий клофазимину.

Цитотоксическую активность клофазимина в отношении различных линий ОК наглядно иллюстрирует рисунок 11.

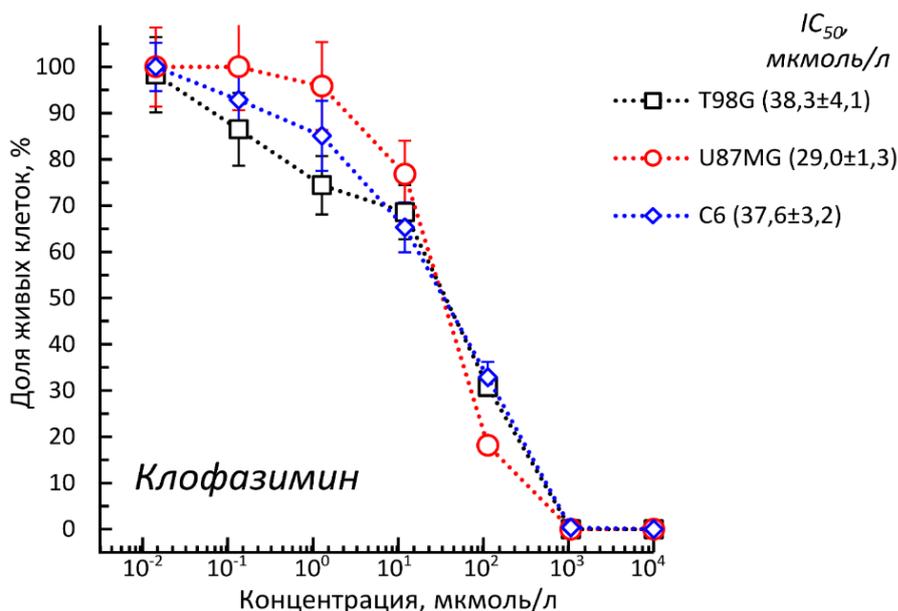


Рисунок 11 – Цитотоксическая активность клофазимина в отношении ОК линий C6, T98G и U87MG глиобластомы человека. По оси ОХ – концентрации клофазимина, мкмоль/л, по оси ОУ – доля живых ОК, в % за 24 ч экспозиции

Сравнение цитотоксической активности клофазимина на ОК и фибробластах показало, что цитотоксический эффект КФЗ в отношении фибробластов был менее выражен, IC_{50} составило $64,7 \pm 5,2$ мкмоль/л, что свидетельствует о меньшей токсичности КФЗ в отношении фибробластов по сравнению с ОК.

ГБ-гетерогенная опухоль, представленная ОК различных фенотипов. В этой связи показательно, что для трех протестированных линий ГБ усредненный показатель IC_{50} составляет $34,9 \pm 2,9$ мкмоль/л.

3.3 Влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков *in vitro*

3.3.1 Влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков на модели глиобластомы

Темозоломид в концентрации $241,2 \pm 2,1$ мкмоль/л вызывал гибель более половины популяции ОК линии C6 (Рисунок 12) за 24 ч наблюдений. В отношении ОК линии U87MG цитотоксическая активность данного препарата была более

высокой, показатель IC_{50} составил $144 \pm 13,2$ мкмоль/л. Цитотоксическая активность ТМЗ многократно снижалась в отношении клеток линии Т98G, IC_{50} составила $735,3 \pm 23,6$ мкмоль/л.

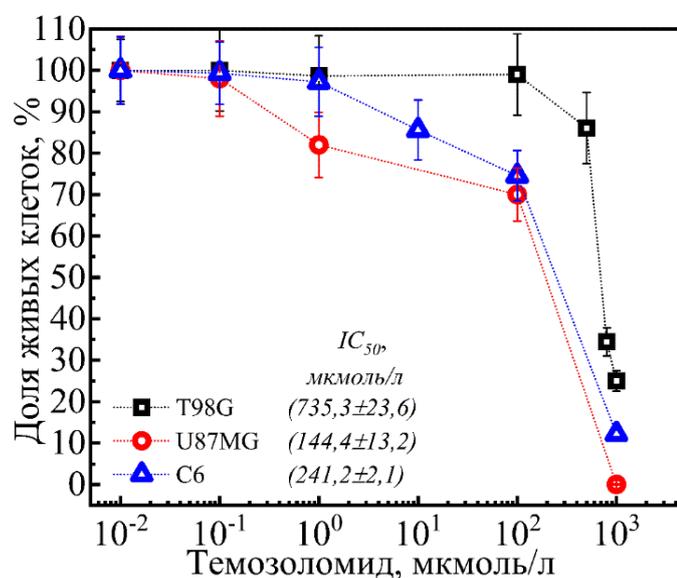


Рисунок 12 – Цитотоксическая активность темозоломида в отношении ОК линий Т98G и U87 MG глиобластомы человека, С6 глиомы крысы. По оси ОХ – концентрация ТМЗ, мкмоль/л. По оси ОУ – доля живых клеток, %

В ходе дальнейшего исследования были рассчитаны IC_{50} цитостатических лекарственных препаратов (Таблица 5).

Таблица 5 – IC_{50} цитостатических лекарственных препаратов для ОК, используемых в эксперименте

Лекарственные препараты, мкмоль/л	С6	U87MG	T98G
Ломустин	$41,5 \pm 5,3$	$75,4 \pm 8,5$	$92,3 \pm 9,5$
5-фторурацил	$7,5 \pm 1,9$	$9,3 \pm 1,2$	$15,4 \pm 0,8$
Иринотекан	$3,5 \pm 1,2$	$4,6 \pm 0,4$	$6,3 \pm 0,4$
Карбоплатин	$10,2 \pm 3,7$	$9,7 \pm 1,6$	$19,9 \pm 1,1$
Паклитаксел	$5,8 \pm 1,1$	$3,5 \pm 0,9$	$9,4 \pm 0,7$

Клофазимин в комбинации с ТМЗ в диапазоне полуингибирующих концентраций оказывал выраженное цитотоксическое действие в отношении всех трех линий ОК. Наибольший цитотоксический эффект комбинации КФЗ и ТМЗ был характерен для ОК линии С6 и Т98 G *in vitro* (Рисунок 13).

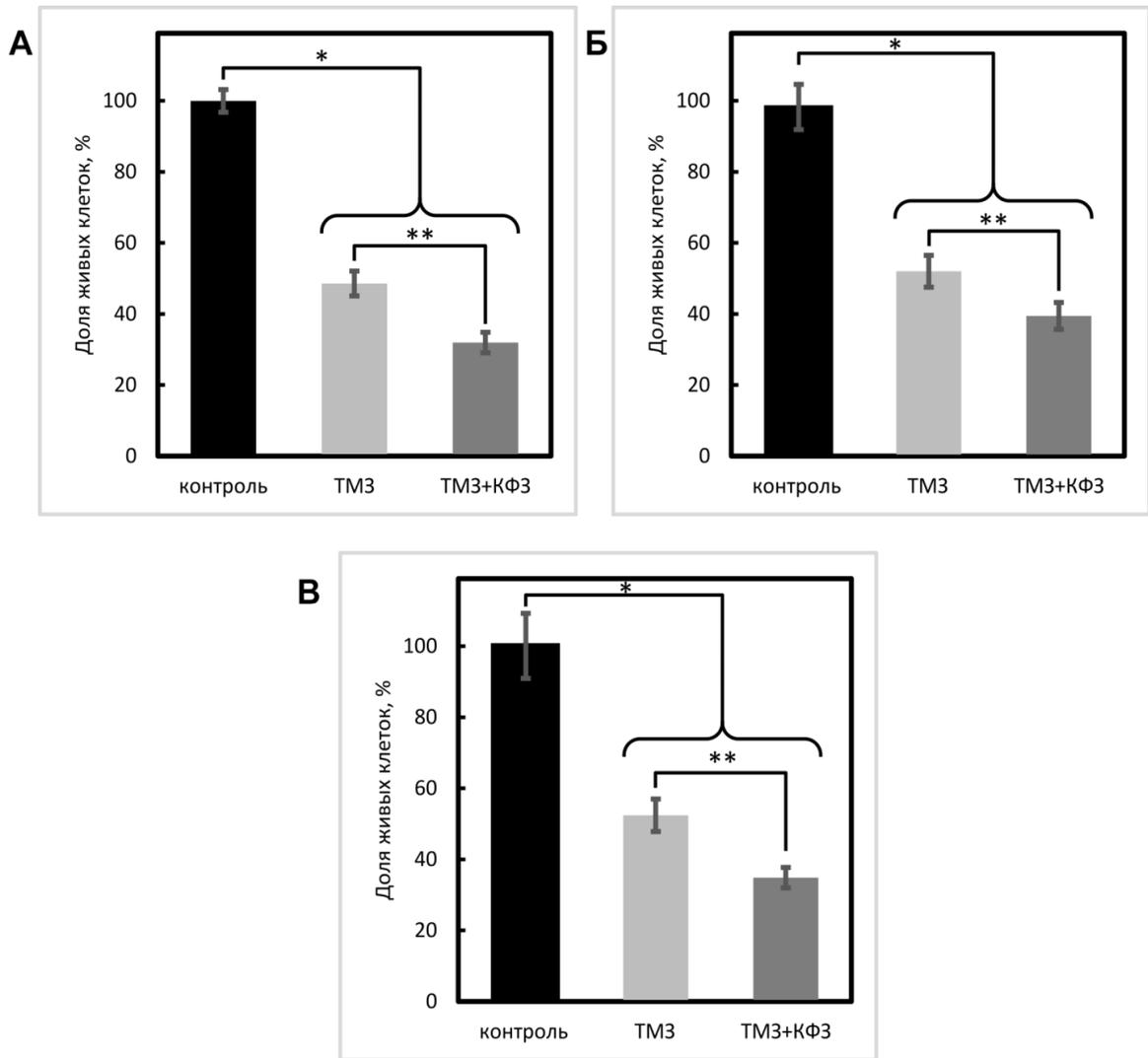


Рисунок 13 – Результаты совместного фармакологического тестирования на клетках глиобластомы *in vitro*. А. ОК глиомы С6; Б. U87MG; В. T98G. По оси ОХ – тестируемые вещества и их комбинация, по оси ОУ – количество жизнеспособных клеток за 24 ч экспозиции. В качестве контроля использовались интактные клетки

Ломустин – противоопухолевый препарат алкилирующего действия, в концентрации $41,5 \pm 5,3$ мкмоль/л вызывал гибель половины популяции ОК линии С6, IC_{50} данного препарата для ОК линии U87MG и T98G составили $75,4 \pm 8,5$ и $92,3 \pm 9,4$ мкмоль/л, соответственно (Таблица 5). Комбинация ломустина и КФ3 не приводила к достоверному усилению цитотоксического эффекта цитостатика на клетках глиобластомы T98G (Рисунок 14). При этом клофазимин достоверно усиливал цитотоксическое действие ломустина в отношении ОК линий как С6, так и в отношении U87MG (Рисунок 14 А-В).

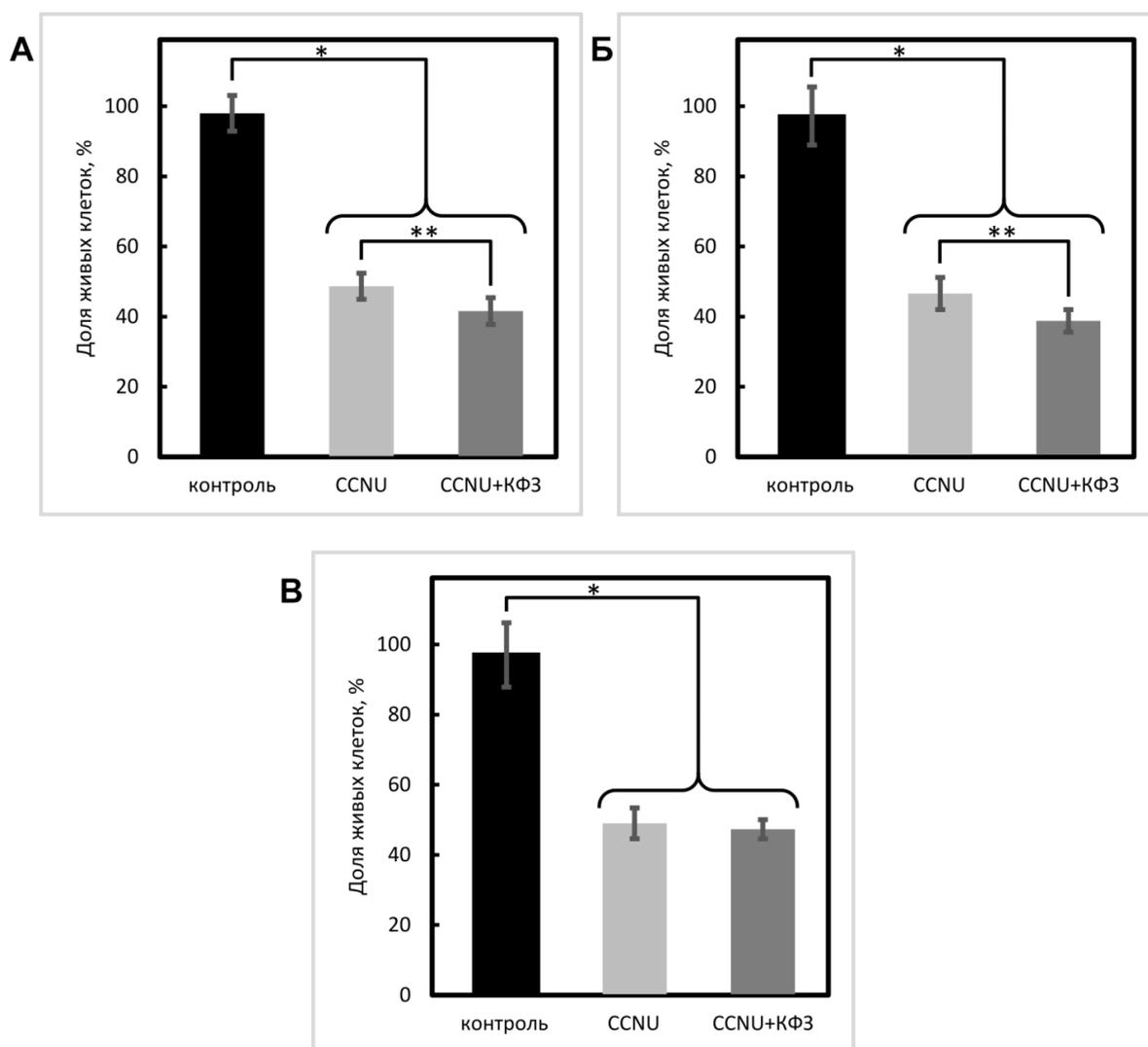


Рисунок 14 – Результаты совместного фармакологического тестирования на клетках глиобластомы *in vitro*. А. ОК глиомы С6; Б. U87MG; В. Т98G. По оси ОХ – тестируемые вещества и их комбинация, по оси ОУ – количество жизнеспособных клеток за 24 ч экспозиции. В качестве контроля использовались интактные клетки

5-ФУ – антиметаболит урацила, в концентрации $7,5 \pm 1,9$ мкмоль/л вызывал гибель половины популяции ОК линии С6, IC_{50} данного препарата для ОК линии U87MG и Т98G составили $9,3 \pm 1,2$ и $15,4 \pm 0,8$ мкмоль/л, соответственно (Таблица 5). Клофазимин достоверно усиливал цитотоксическое действие 5 ФУ в отношении ОК линий как С6, так и в отношении U87MG (Рисунок 15 А и Б). Комбинация КФЗ и 5-ФУ в диапазоне полуингибирующих концентраций не приводила к достоверному усилению цитотоксического эффекта 5-фторурацила на клетках глиобластомы Т98G (Рисунок 15 В).

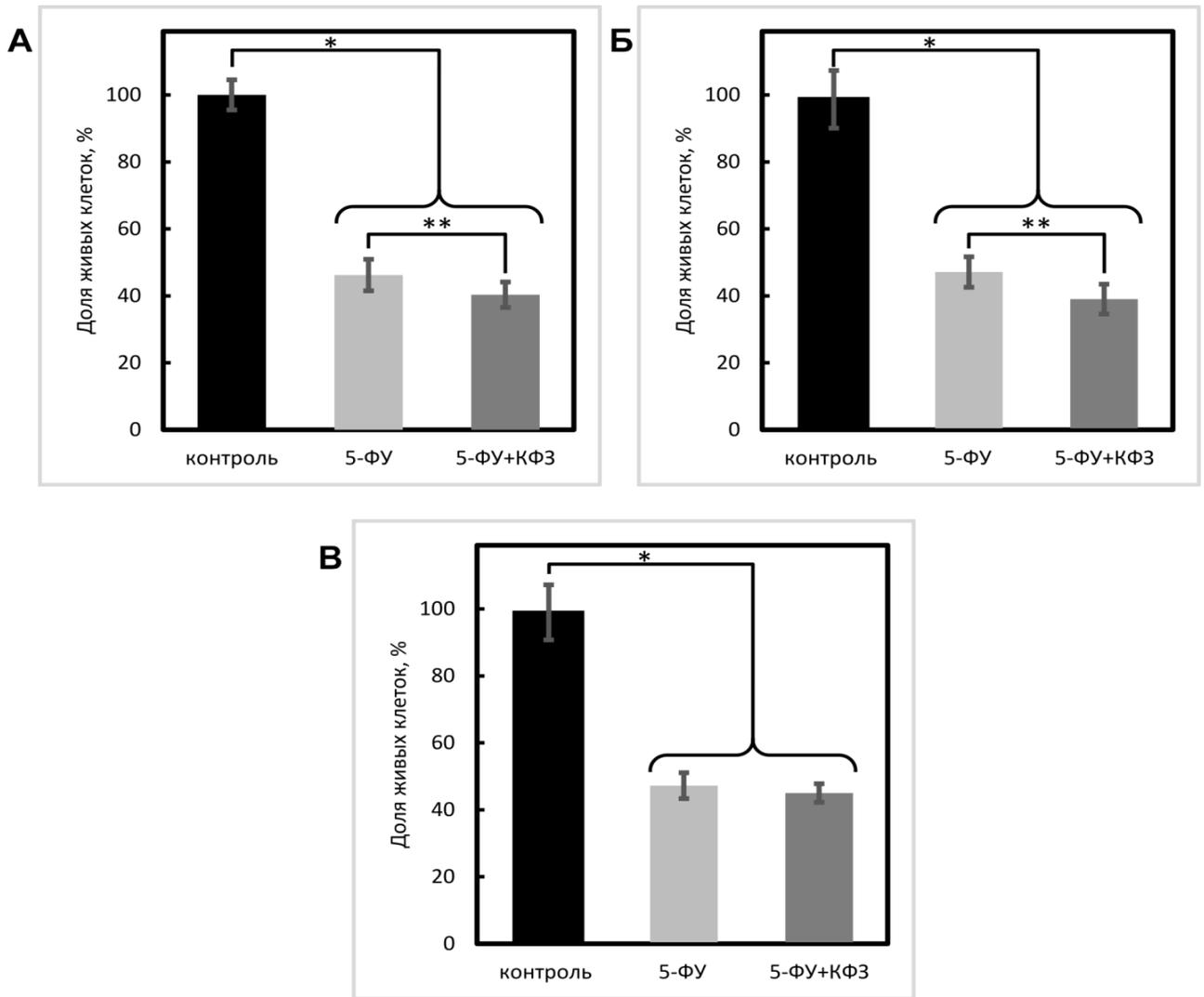


Рисунок 15 – Результаты совместного фармакологического тестирования на клетках глиобластомы *in vitro*. А. ОК глиомы С6; Б. U87MG; В. T98G. По оси ОХ – тестируемые вещества и их комбинация, по оси ОУ – количество жизнеспособных клеток за 24 ч экспозиции. В качестве контроля использовались интактные клетки

Иринотекан – ингибитор топоизомеразы I, в концентрации $3,5 \pm 1,2$ мкмоль/л, вызывал гибель половины популяции ОК линии С6, IC_{50} иринотекана для линий U87MG и T98G составили $4,6 \pm 0,4$ и $6,3 \pm 0,4$ мкмоль/л, соответственно (Таблица 5). Клофазимин незначительно усиливал цитотоксическое действие иринотекана на ОК линии С6 (Рисунок 16 А), однако данный эффект не был отмечен в отношении клеток линий U87 MG и T98G (Рисунок 16 Б и В).

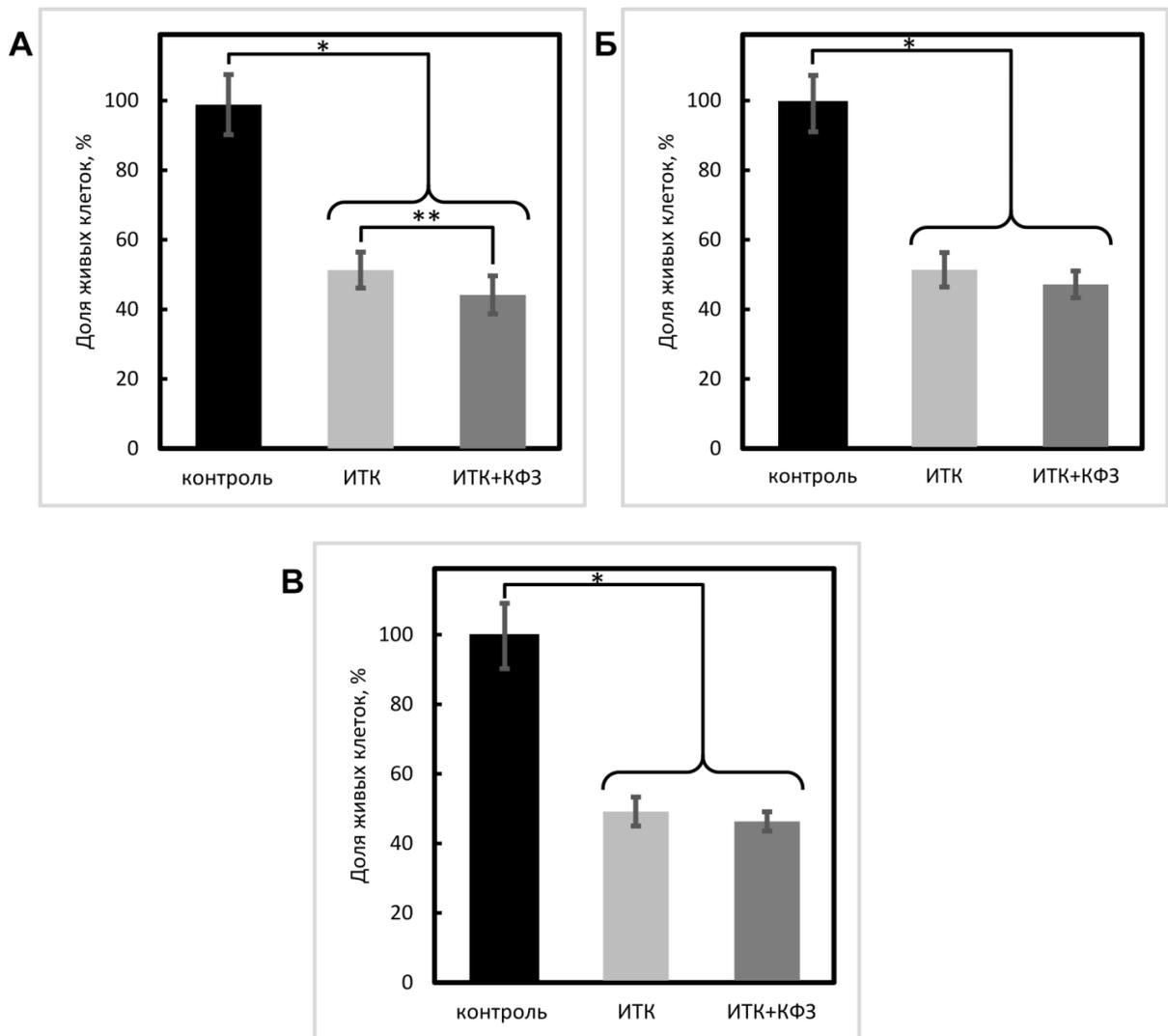


Рисунок 16 – Результаты совместного фармакологического тестирования на клетках глиобластомы *in vitro*. А. ОК глиомы С6; Б. U87MG, В. T98G. По оси ОХ – тестируемые вещества и их комбинация, по оси ОУ – количество жизнеспособных клеток за 24 ч экспозиции

Цитостатический препарат алкилирующего действия – Карбоплатин, в концентрации $10,2 \pm 3,7$ мкмоль/л вызывал гибель половины популяции ОК линии С6, IC_{50} данного препарата для ОК линии U87MG и T98G составило $9,7 \pm 1,6$ и $19,9 \pm 1,1$ мкмоль/л, соответственно (Таблица 5). Комбинация карбоплатина и клофазимина приводила к усилению цитотоксического эффекта цитостатика, который достоверно отмечался на ОК всех трех линиях глиом (Рисунок 17).

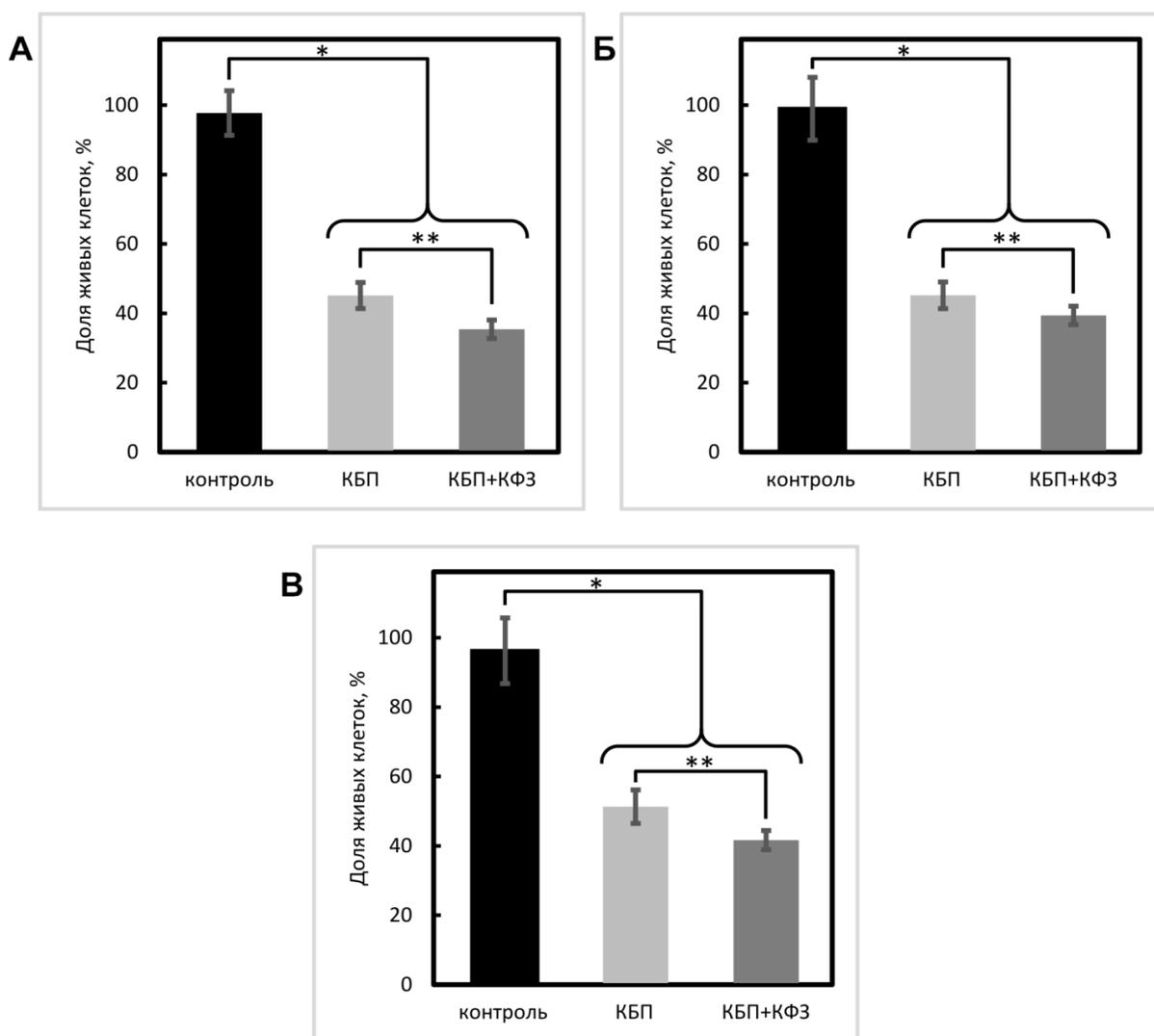


Рисунок 17 – Результаты совместного фармакологического тестирования на клетках глиобластомы *in vitro*. А. ОК глиомы С6; Б. U87MG; В. T98G. По оси ОХ – тестируемые вещества и их комбинация, по оси ОУ – количество жизнеспособных клеток за 24 ч экспозиции. В качестве контроля использовались интактные клетки

Синтетический противоопухолевый препарат – паклитаксел, в концентрации $5,8 \pm 1,1$ мкмоль/л вызывал гибель половины популяции ОК линии С6, IC_{50} данного препарата для ОК линии U87MG и T98G составило $3,5 \pm 0,9$ и $9,4 \pm 0,7$ мкмоль/л, соответственно (Таблица 5). В отношении ОК линии С6 глиомы крысы данный эффект не был достоверно выражен (Рисунок 18 А). Комбинация паклитаксела и клофазимина приводила к усилению цитотоксического эффекта цитостатика, который достоверно отмечался на ОК глиобластомы человека как линии T98G, так и U87 MG (Рисунок 18 Б и В).

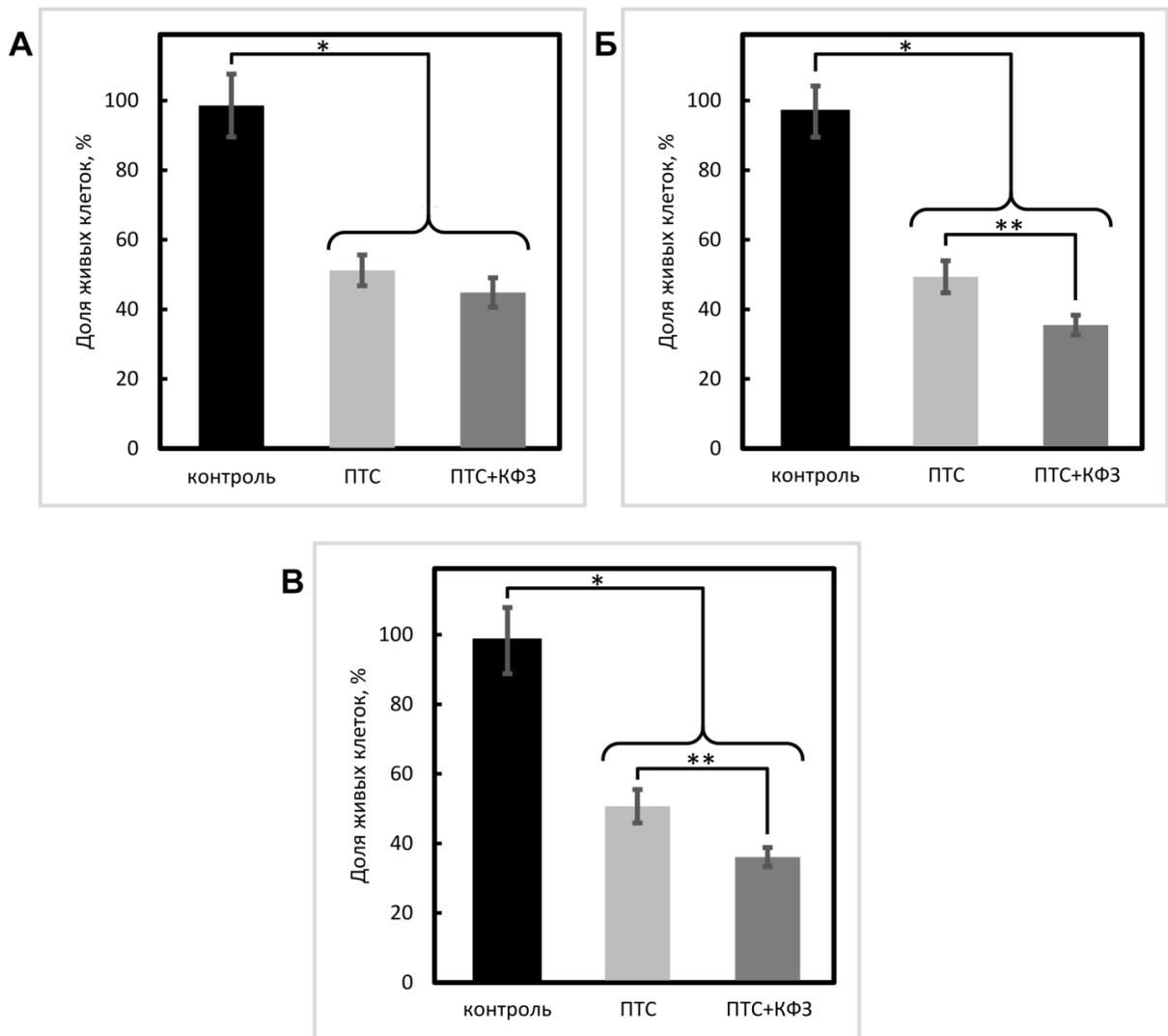


Рисунок 18 – Результаты совместного фармакологического тестирования на клетках глиобластомы *in vitro*. А. ОК глиомы С6; Б. U87MG; В. T98G. По оси ОХ – тестируемые вещества и их комбинация, по оси ОУ – количество жизнеспособных клеток за 24 ч экспозиции. В качестве контроля использовались интактные клетки

3.3.2 Влияние клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков на модели глиобластомы с индуцированной резистентностью к темозоломиду

При последовательной двукратной обработке темозоломидом клеток тестируемых линий происходило достоверное снижение цитотоксической активности данного препарата (Рисунок 19). При этом наиболее значимые различия показателя IC₅₀ были характерны для линии T98G, который составил 972,4±19,6 мкмоль/л против 735,3±23,6 мкмоль/л в контроле, исходя из этих

позиций данная линия была выбрана как наиболее информативная для дальнейшего изучения возможности комбинации цитостатических средств и клофазимина.

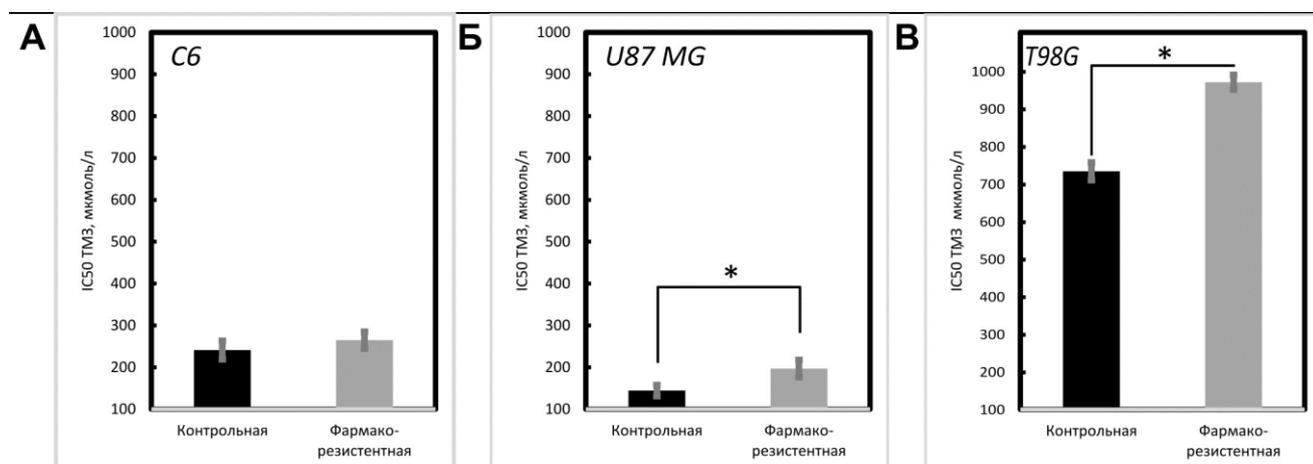


Рисунок 19 – Значение IC₅₀ TM3 клеток линии T98G на фоне последовательной двукратной обработки TM3. А. ОК глиомы C6; Б. U87MG; В. T98G. По оси ОХ: контроль, подвергнутые действию TM3; По оси ОУ: IC₅₀ TM3 по каждой точке - не менее 30

В ходе дальнейшего исследования были рассчитаны IC₅₀ цитостатических лекарственных препаратов для фармакорезистентных ОК линии T98G (Таблица 6).

Таблица 6 – IC₅₀ цитостатических лекарственных препаратов для фармакорезистентных ОК линии T98G, используемых в эксперименте

Лекарственные препараты, мкмоль/л	T98G
Ломустин	148,7±13,2
5-фторурацил	37,5±2,9
Иринотекан	11,5±1,3
Карбоплатин	23,8±2,5
Паклитаксел	15,7±1,8

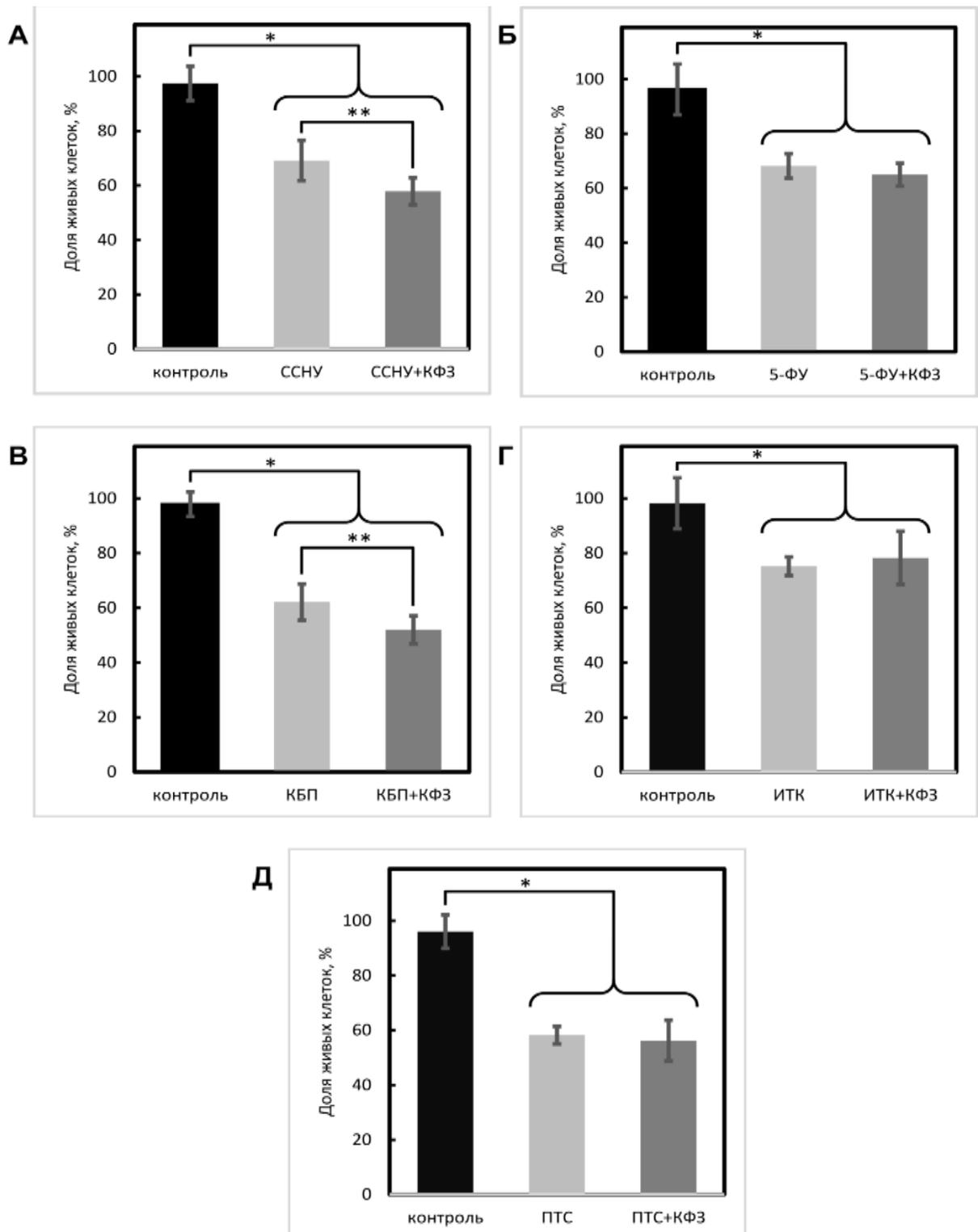


Рисунок 20 – Результаты совместного фармакологического тестирования на фармакокорезистентных клетках Т98G глиобластомы человека *in vitro*. А. ОК глиомы С6; Б. U87MG; В. Т98G. По оси ОХ – тестируемые вещества и их комбинация, по оси ОУ- количество жизнеспособных клеток за 24 ч экспозиции. В качестве контроля использовались интактные клетки

В диапазоне полуингибирующих концентраций, соответствующих IC_{50} для фармакорезистентной клеточной культуры, тестируемые лекарственные препараты демонстрировали менее выраженное цитотоксическое действие в отношении клеток ГБ (Рисунок 20).

Комбинация клофазимина с другими цитостатиками не приводила к достоверному усилению цитотоксического эффекта цитостатиков (Рисунок 20 А, Г, Д). Клофазимин достоверно усиливал цитотоксическое действие ломустина и карбоплатина в отношении фармакорезистентных ОК Т98G глиобластомы человека (Рисунок 20 Б и В).

Таким образом, IC_{50} клофазимина для клеток глиомы С6 составляет $37,6 \pm 3,2$ мкмоль/л, для клеток ГБ линии U87MG и Т98G составляет $29,0 \pm 1,3$ мкмоль/л и $38,3 \pm 4,1$ мкмоль/л. Клофазимин оказывает дозозависимое цитостатическое и цитотоксическое действие на ОК глиом, усиливает цитотоксическую активность темозоломида, паклитаксела и карбоплатина. Клофазимин усиливает цитотоксическое действие ломустина и карбоплатина в отношении фармакорезистентных клеток Т98G.

3.4 Антиглиомная эффективность клофазимина *in vivo*

3.4.1. Нейровизуалиционная характеристика опухоли в мозге экспериментальных животных различных групп

Имплантация клеток глиомы С6 в область каудопутамена приводила к быстрому формированию объемной опухоли в мозге крысы, хорошо визуализируемой на 14 сутки эксперимента с помощью МРТ (Рисунок 21).

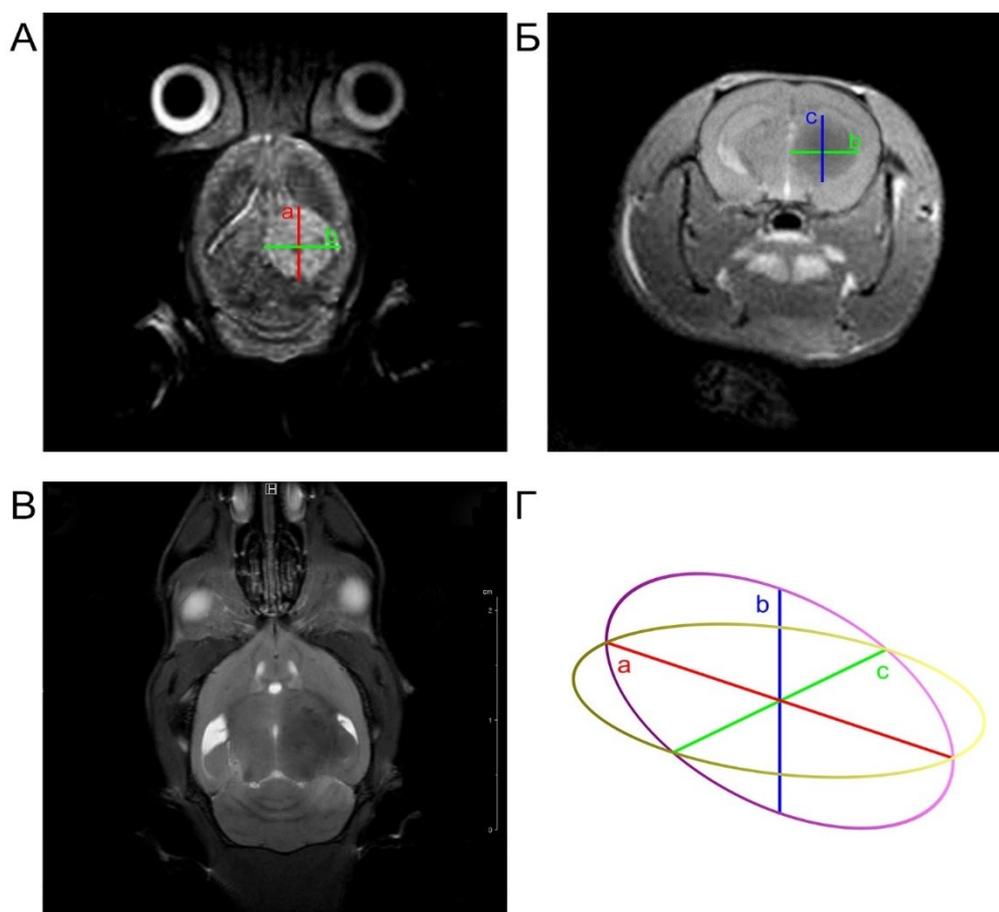


Рисунок 21 – Опухоль в мозге экспериментальных животных, магнитно резонансная томография T1-взвешенный режим. А. сагиттальное; Б. фронтальное изображения; В-Г. срезы мозга в сагитальной проекции; Д. схема вычисления объема эллипса: а, b, с – полуоси эллипсоида

К 30 дню наблюдений опухоль занимала большую часть пораженного полушария мозга, что сопровождалось сдавлением мозговых желудочков, отеком вещества мозга и дислокацией срединных структур (Рисунок 21 А и Б).

Размер опухолевого узла существенно различался у животных различных групп (Рисунок 22).

По данным МРТ, средний размер опухоли у контрольных животных $226,13 \pm 19,11 \text{ мм}^3$, в группе ХЛТ, размеры опухоли был $114,65 \pm 9,8 \text{ мм}^3$, что достоверно ($p < 0,05$) меньше, чем в контрольной группе. У крыс третьей группы, получавших ХЛТ в комбинации с КФЗ, размер опухолевого узла не имел достоверных отличий с группой ХЛТ ($98,23 \pm 10,7 \text{ мм}^3$).

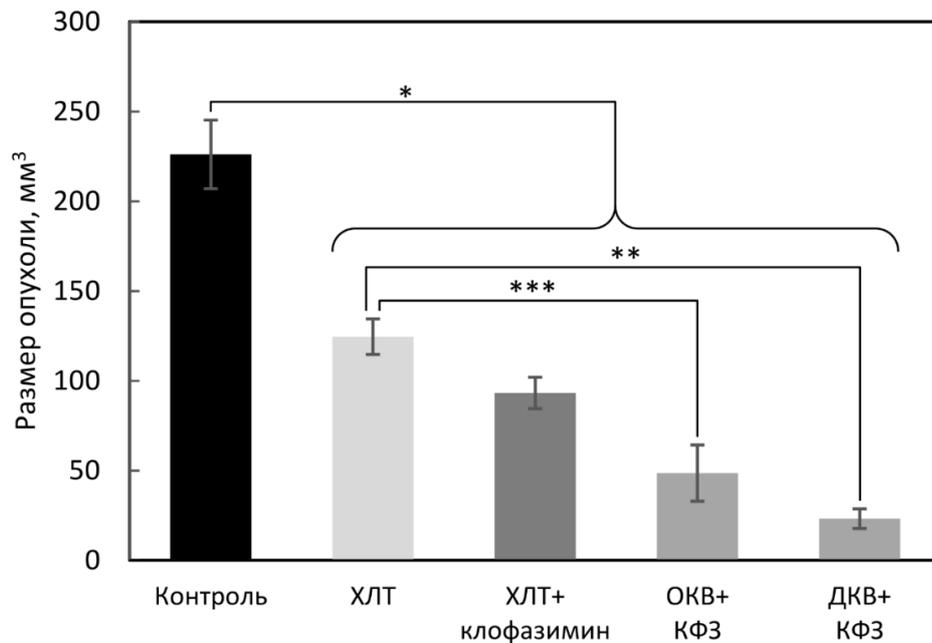


Рисунок 22 – Размер опухолевого узла в мозге крыс сравниваемых групп (мм³), 30-й день эксперимента

У экспериментальных животных групп ОКВ+КФЗ и ДКВ+КФЗ отмечались достоверно значимые изменения объема опухоли в мозге крыс по сравнению с группой ХЛТ, средние размеры опухолевого узла составили $48,57 \pm 5,9$ и $23,19 \pm 8,6$ мм³, соответственно.

3.4.2 Характеристика функционального статуса экспериментальных животных с глиомой С6

Функциональный статус экспериментальных животных соответствовал тяжести поражения мозга. К 14 дню эксперимента в отличие от интактного контроля, крысы с глиомой С6 были малоподвижными, проводили большую часть времени закрыв глаза, свернувшись или прижавшись друг к другу, не интересовались событиями в клетке и за ее пределами, утрачивали аппетит, пренебрегали грумингом. При взятии на руки оставались пассивными, при расположении на поверхности стола длительно не проявляли активности, либо совершали бесцельные круговые движения, быстро утомляясь. У части животных

отмечались судорожные подергивания в конечностях на контралатеральной стороне тела.

К 21 дню эксперимента животные контрольные животные с глиомой С6 становилась вялыми и значимо утрачивали массу тела (Рисунок 23).

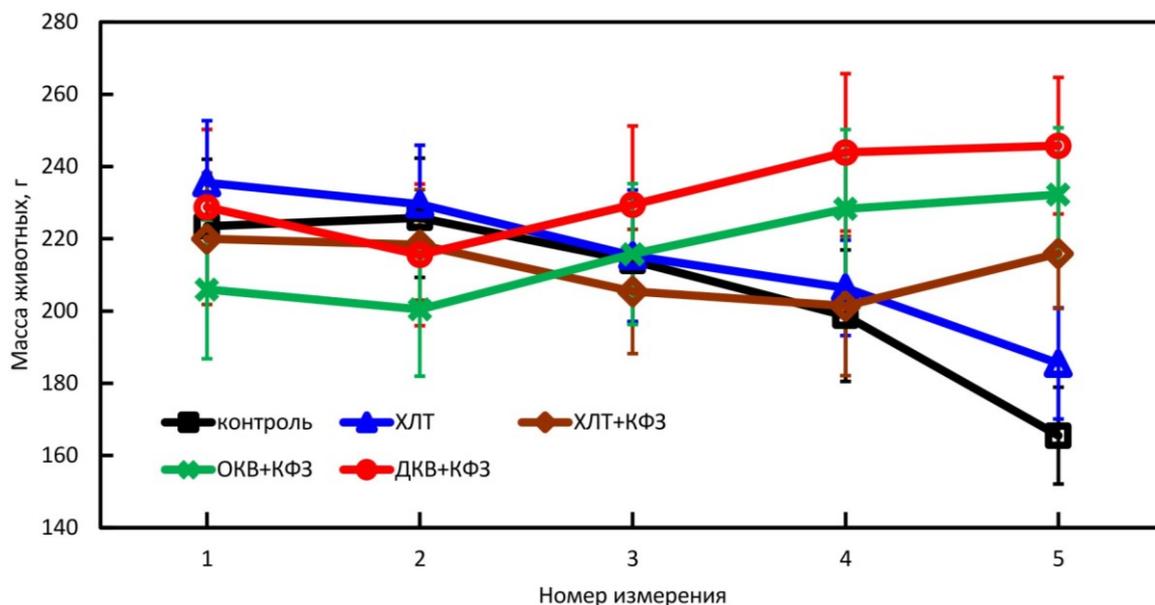


Рисунок 23 – Изменение массы тела экспериментальных животных при различных вариантах лечения. По оси ОХ – номер измерения по порядку, по оси ОУ – масса животных, г

К 21 дню наблюдений при осмотре животных отмечалось одностороннее выбухание глазного яблока с признаками перикорнеальной инъекции сосудов на стороне поражения. При взятии на руки животные оставались заторможенными, прикосновение к вибрисам не вызывало реакции, на стороне поражения отсутствовал роговичный рефлекс, повышение мышечного тонуса в передних и задних лапах на контралатеральной опухоли стороне сопровождалось спастическими судорожными подергиваниями и появлением синкинезий в ответ на сжатие конечностей здоровой стороны. При расположении на поверхности стола животное практически не проявляло интереса к окружающей обстановке, плотно сворачивалась в клубок либо совершало бесцельные круговые движения активно озираясь по сторонам. Критерием вывода из эксперимента служила утрата

сознания с появлением патологического дыхания при отсутствии реакции на сторонние раздражители (Рисунок 24).

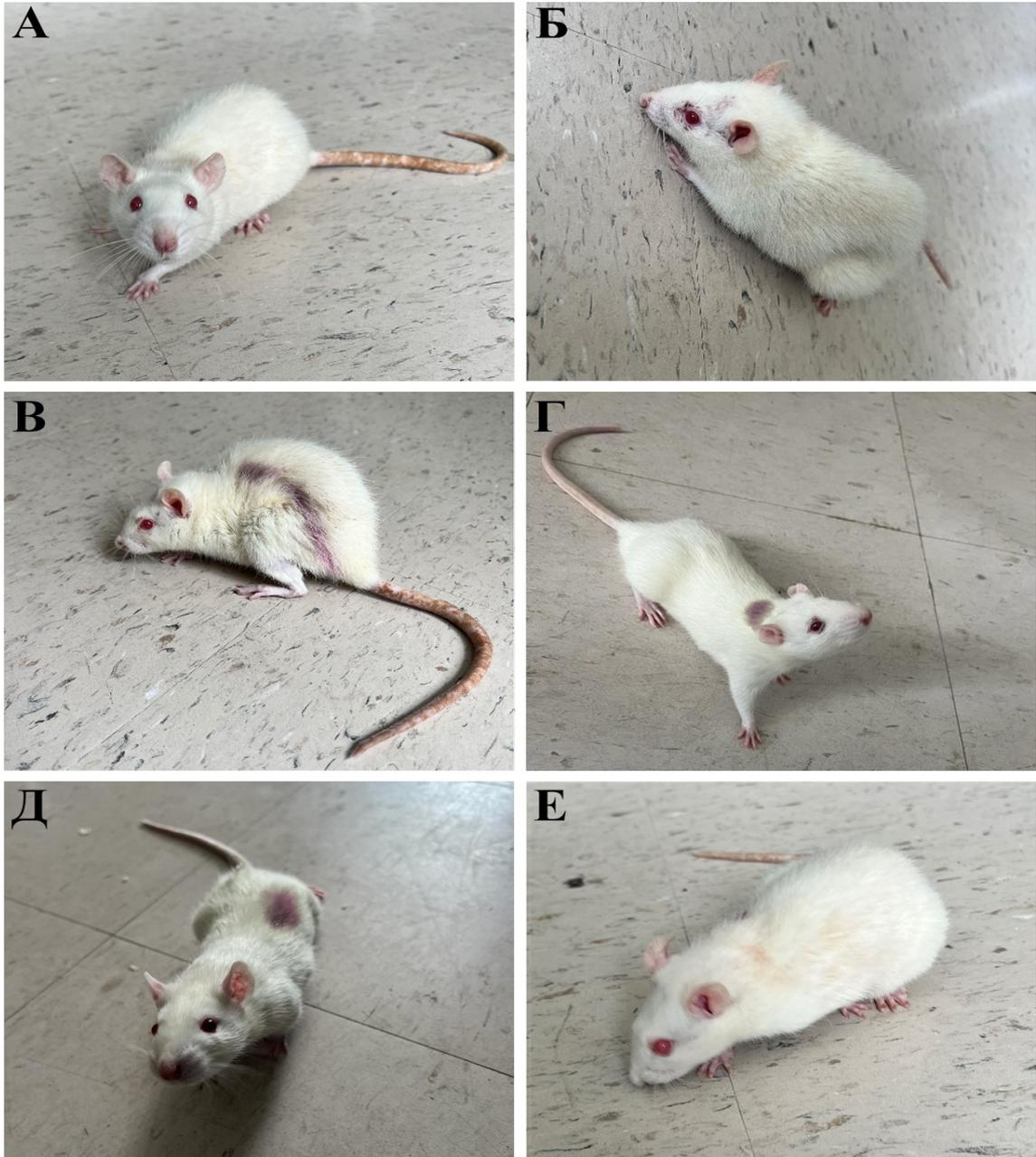


Рисунок 24 – Внешний вид животных задействованных в эксперименте: А. Интактный контроль (здоровые животные); Б. контроль, с глиомой С6; В. крысы группы ХЛТ; Г. ХЛТ+КФ3; Д. ОКВ+КФ3; Е. ДКВ+КФ3

Состояние животных группы ХЛТ, получивших облучение в сочетании с введением ТМЗ, к 30 дню наблюдений существенно отличалось от контроля. Крысы были более активны, подвижны в пределах клетки, при взятии на руки оказывали некоторое сопротивление порываясь скрыться, часть животных

проявляла признаки умеренного возбуждения. При осмотре животных обращало внимания наличие очагов кожной алопеции, кандидоз слизистой рта, появление фокальных изъязвлений на лапках. Животные сохраняли способность к целенаправленным движениям с использованием передних и задних лап, способность подняться на задние лапы, уделяли внимание грумингу, интересовались едой, не теряли массу тела. Принципиальных отличий с животными третьей группы на данном этапе выявлено не было. Субъективно, животные группы ХЛТ+КФЗ, равно как и крысы, получившие в дополнение к этой схеме ОКВ и ДКВ, к 21 дню наблюдений были более активные и подвижные, причем для группы ДКВ+КФЗ была характерна прибавка к массе тела.

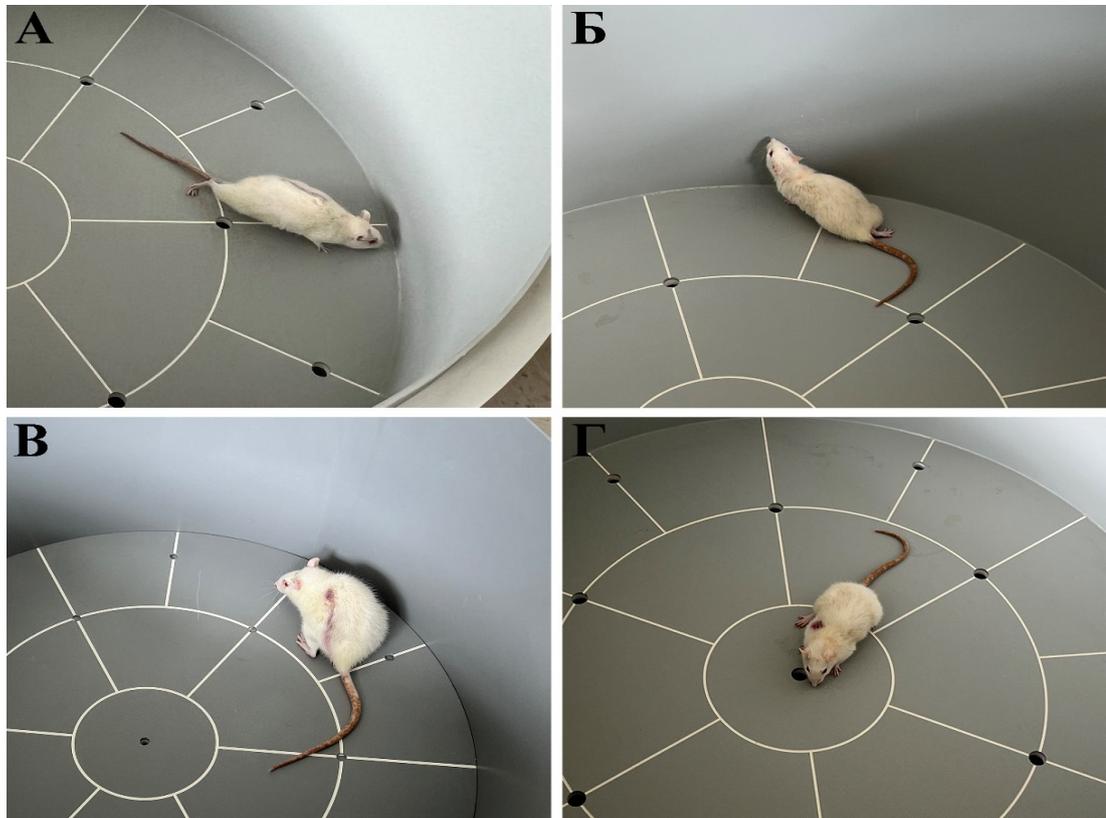


Рисунок 25 – Тест «Открытое поле». Горизонтальная активность: А. перемещение между секторами; Б. Вертикальная активность – задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля; В. горизонтальная активность животного контрольной группы; Г. посещение центра и обследование отверстий

Оценка поведенческой активности животных, задействованных в эксперименте, была проведена с использованием теста «Открытое поле» (Рисунок 25). Поведенческая активность существенно менялась во всех группах с 14 дня эксперимента (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты теста «Открытое поле»

	Контроль		ХЛТ		ХЛТ+КФЗ		КФЗ+ОКВ		КФЗ+ДКВ	
	10	21	10	21	10	21	10	21	10	21
Контрольные дни	10	21	10	21	10	21	10	21	10	21
Горизонтальная активность: число пересеченных секторов по периметру	32,5 ±1,9	21,3 ±1,5	53,5 ±1,7 *	46,2 ±1,4 **	55,3 ±1,1 *	51,9 ±0,9 **	50,1 ±2,1 *	56,9 ±0,2 **	49,1 ±2,1 *	54,3 ±0,2 **
Горизонтальная активность: число посещений центра	0,9± 0,1	0,5± 0,04	1,5 ±0,05 *	1,2± 0,06* *	1,4 ±0,02 *	2,8 ±0,07 **	1,2 ±0,02 *	2,9 ±0,7 **	1,2 ±0,0 2*	2,9 ±0,7 **
Вертикальная активность: число вертикальных стоек передние упираются в стенку поля	2,3 ±0,1	1,4 ±0,02	8,5 ±0,3 **	3,2 ±0,1 **	9,7 ±0,4 **	11,2 ±0,6 **	9,7 ±0,4 **	11,2 ±0,6 **	9,7 ±0,4 **	11,2 ±0,6 **
Вертикальная активность: число вертикальных стоек передние лапы остаются на весу	2,7 ±0,2	0,3 ±0,01	3,1 ±0,1 *	2,5 ±0,19 **	2,5 ±0,01	2,5 ±0,1 **	2,5 ±0,01	2,9 ±0,1 **	2,5 ±0,01	2,9 ±0,1 **
Груминг	0,3 ±0,02	0,1 ±0,04	1,2 ±0,1 **	0,7 ±0,05 **	2,1 ±0,2 **	2,9 ±0,2 **	1,9 ±0,2 **	2,9 ±0,2 **	1,9 ±0,2 **	2,9 ±0,2 **
Число заглядываний в норки	2,1 ±0,03	0,8 ±0,05	5,3 ±0,3 **	3,7 ±0,02 **	5,3 ±0,2 **	10,5 ±0,4 **	5,3 ±0,2 **	10,5 ±0,4 **	5,3 ±0,2 **	10,5 ±0,4 **
Дефекация, число болюсов	1,3 ±0,08	0,9 ±0,02	1,2 ±0,01	1,5 ±0,06 *	0,5 ±0,02 *	0,3 ±0,02 *	0,5 ±0,02 *	0,3 ±0,02 *	0,5 ±0,1 *	0,3 ±0,2 *

В контрольной группе, горизонтальная активность, включая число пересеченных квадратов по периметру и посещение центра, было существенно меньше, чем у крыс, получивших ХЛТ и животных группы ХЛТ+КФЗ и крыс групп ХЛТ+КФЗ+ОКВ и ХЛТ+КФЗ+ДКВ. При этом важно, что контрольные животные

перемещались неуверенно, часто заваливаясь в сторону пораженных конечностей. Вертикальная активность, у контрольных крыс также была достоверно ниже, чем у крыс групп ХЛТ, ХЛТ+КФЗ и других групп, задействованных в эксперименте.

У контрольных животных преобладала вертикальная активность с опорой на стенку поля, при этом переходу в вертикальное положение с удержанием лап на весу препятствовала дисфункция одной из нижних конечностей на стороне контралатеральной опухоли.

Груминг у животных контрольной группы характеризовался 1-2 быстрыми круговыми движениями лап вокруг носа или около него, в то время как в группе ХЛТ, ХЛТ+КФЗ и других групп преобладал длительный груминг с умыванием области глаз, заведением лап за уши и переходом на умывание головы, лап, боков, туловища, аногенитальной области, хвоста.

Ориентировочно-исследовательская активность крыс контрольной группы также значительно снижалась, что проявлялось снижением количества заглядываний в норке и резким ростом тревожности, в виде увеличения числа болюсов при дефекации.

На 21 день крысы группы ХЛТ и других экспериментальных групп проявляли большую вертикальную и горизонтальную активность, возрастало число актов короткого и длинного груминга, повышалась исследовательская активность, что указывало на существенное улучшение поведенческих функций. В свою очередь, число актов дефекации в этих группах значительно уменьшилось по сравнению с контролем, что свидетельствовало об эффективности проводимого лечения и снижении уровня тревожности.

3.4.3 Оценка гематологического и цитокинового статуса у крыс различных групп

ХЛТ сопровождалось значительным снижением числа лейкоцитов в периферической крови экспериментальных животных с глиомой С6 (Рисунок 26 А). В группе ХЛТ+КФЗ число клеток ИР в отношении общелейкоцитарного антигена CD45 также снижалось, но не обнаруживало достоверных отличий с

группой ХЛТ, что напрямую указывало о прямом цитотоксическом влиянии облучения и ТМЗ на клетки костного мозга. Примечательно, что в группе крыс, получивших ХЛТ+КФЗ+ОКВ или ХЛТ+КФЗ+ДКВ, уровень $CD45^+$ клеток был существенно выше, при этом у крыс получивших ДКВ он был особенно высок.

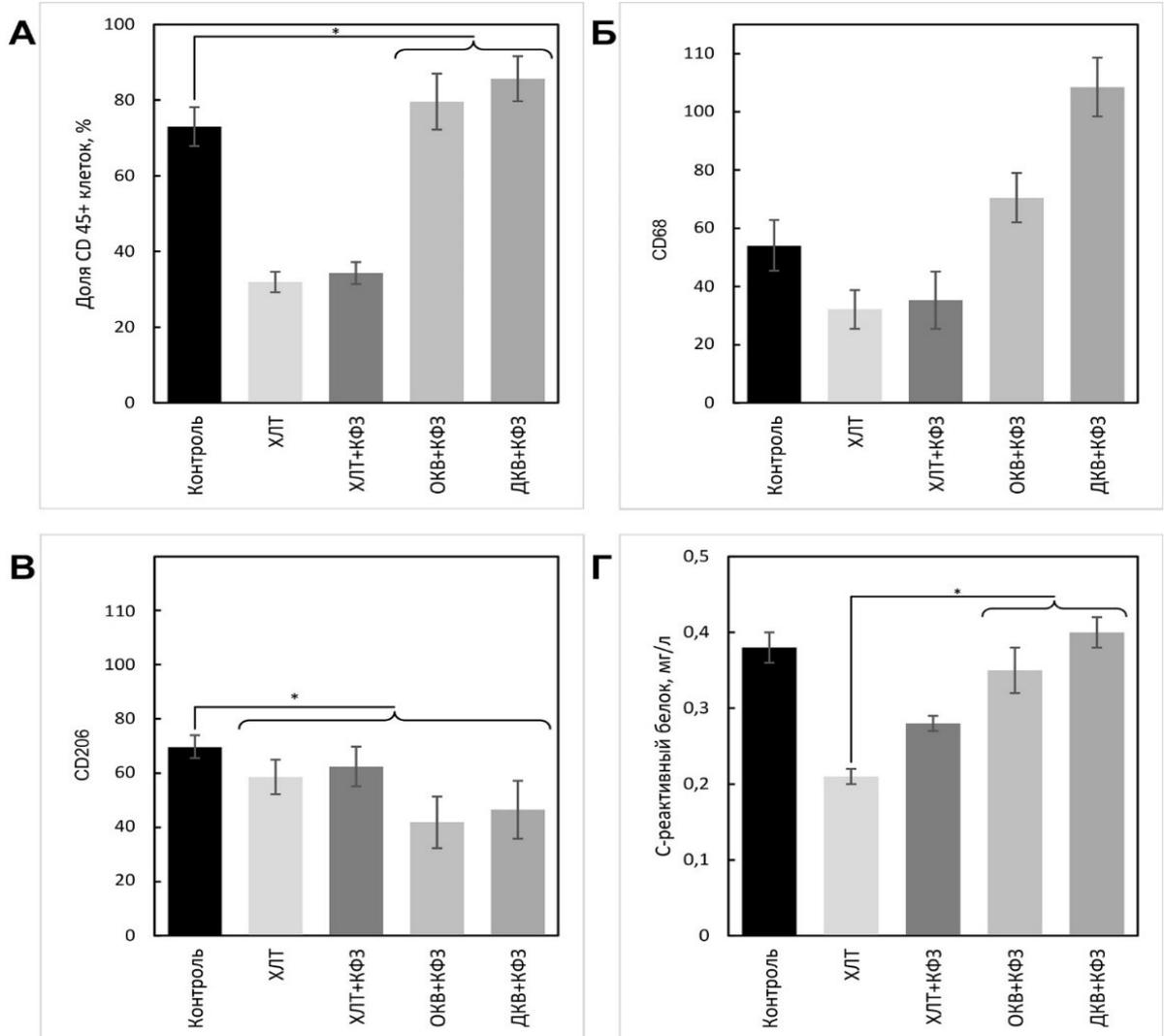


Рисунок 26 – Биохимические показатели экспериментальных животных различных групп, 25 день эксперимента. А. количество клеток ИР в отношении общелейкоцитарного антигена $CD45^+$ в кровеносном русле; Б. содержание аспаратаминотрансферазы, В. Аланинаминотрансферазы, и Г. С-реактивного белка в крови

В пользу иммуносупрессивного действия ХЛТ указывало снижение содержания СВ68 макрофагов у животных группы ХЛТ и ХЛТ+КФЗ (Рисунок 26 Б),

задействованных в эксперименте, при этом применение ОКВ и ДКВ сопровождалось более выраженным повышением содержания СВ68+ клеток, снижением числа CD206-клеток и повышением в крови С-реактивного белка в сыворотке крови (Рисунок 26 В и Г).

Иммунотерапия оказывала существенное влияние на продукцию воспалительных цитокинов в организме экспериментальных животных (Рисунок 27).

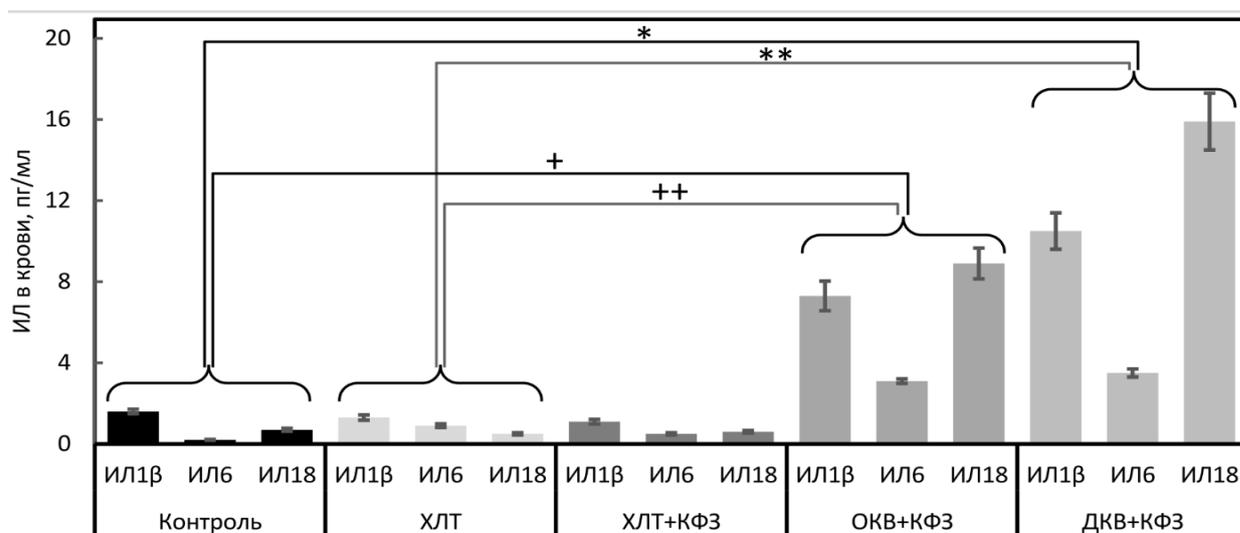


Рисунок 27 – Уровень провоспалительных цитокинов у животных различных групп. По оси ОХ – экспериментальные группы, в качестве контроля использовали группу интактных животных. По оси ОУ – содержание интерлейкинов в крови экспериментальных животных, пг/мл

Введение ОКВ в комбинации с клофазимином вызывало достоверно значимое по сравнению с контролем усиление продукции интерлейкинов 1β, 6 и 18, при этом в группах животных, получивших ДКВ совместно с клофазимином, повышение уровня цитокинов было более очевидным и достоверным. При этом КФЗ не оказывал значимого влияния на уровень интерлейкинов в крови животных сравниваемых групп.

Таким образом, исследование позволяет сделать вывод: химиолучевая терапия уменьшает объем опухоли в головном мозге экспериментальных

животных. Клофазимин усиливает антиглиомное действие химиолучевой терапии, что сопровождается улучшением функционального статуса экспериментальных животных.

3.5 Морфологическая, иммуногистохимическая характеристика и иммуноферментный анализ опухолевой ткани у животных с глиомой

3.5.1 Морфологическая характеристика области введения опухолево-клеточной вакцины в организм животных с глиомой С6 после ХЛТ

При морфологическом исследовании срезов мягких тканей голени крыс с глиомой С6, в области введения ОКВ определялась трапециевидная зона локального коагуляционного некроза с отеком прилежащих тканей, очертаниями некротизированных миоцитов, наличием апоптотических телец, выраженной перифокальной полиморфноклеточной инфильтрацией (Рисунок 28 А), представленной сегментоядерными нейтрофилами, эозинофилами, лимфоцитами, формирующими лимфоидные фолликулы, плазматическими клетками, скоплением макрофагов и гигантских многоядерных клеток по типу инородных тел (Рисунок 28 Б-Г).

Инфильтрация захватывала как поперечно – полосатую мышечную ткань, так жировую ткань, с формированием олеогранулем (Рисунок 26 Б). Формирующаяся демаркационная линия была представлена очагами грануляционной ткани различной степени зрелости с признаками неоангиогенеза, полнокровием в новообразованных сосудах, скоплениями полиморфноядерных лейкоцитов, нагруженными липидами пенистыми гистиоцитами, фибробластами, что сопровождалось перинейрональной полиморфноклеточной инфильтрацией и очаговой фибробластоподобной пролиферацией стромы.

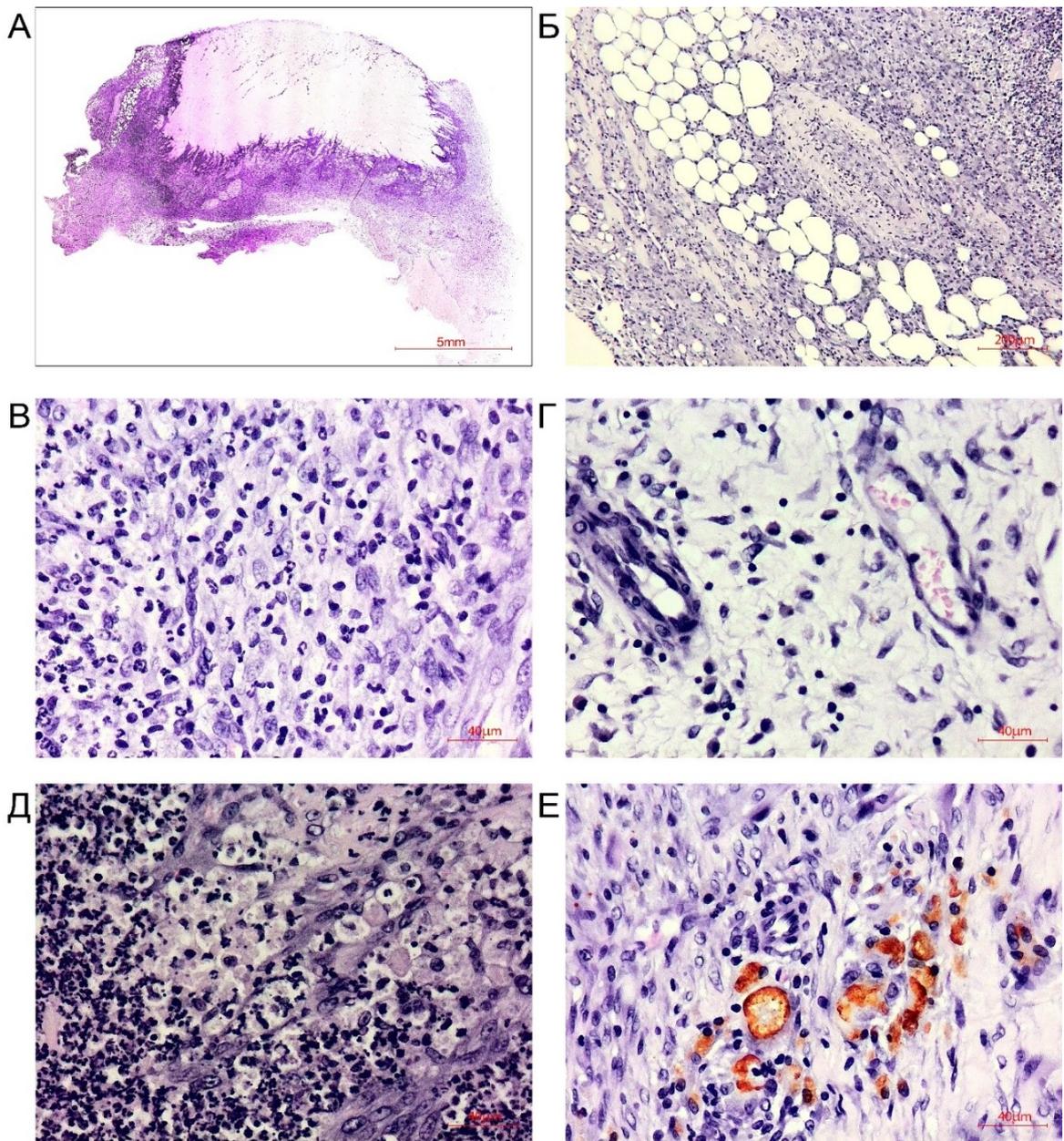


Рисунок 28 – Морфологическая характеристика области введения ОКВ в лапку крысы, 14 день эксперимента, окраска гематоксилин-эозином. А. Локальный коагуляционный некроз мягких тканей; Б. Диффузная полиморфноклеточная инфильтрация, В. Инфильтрат представленный полиморфноядерными лейкоцитами, лимфоцитами, гистиоцитами и фибробластами; Г. Рыхлая соединительная ткань с рассеянной лимфоплазмочитарной инфильтрацией; Д. Фронт инфильтрата, представленный множественными апоптотическими тельцами, некротизированными адипоцитами, полиморфноядерными лейкоцитами, нагруженные липидами пенстыми гистиоцитами, фибробластами; Е. Остатки липофусцинопродобного пигмента, перифокальная фибробластоподобная пролиферация стромы.

3.5.2 Оценка морфологических и иммуногистохимических параметров опухоли в мозге крыс исследуемых групп при иммунотерапии

К 10 дню наблюдений при морфологическом исследовании опухолевый узел в мозге крыс глиомой С6 был представлен скоплением клеток различной формы и величины, содержащих ядра разного размера (Рисунок 29 А).

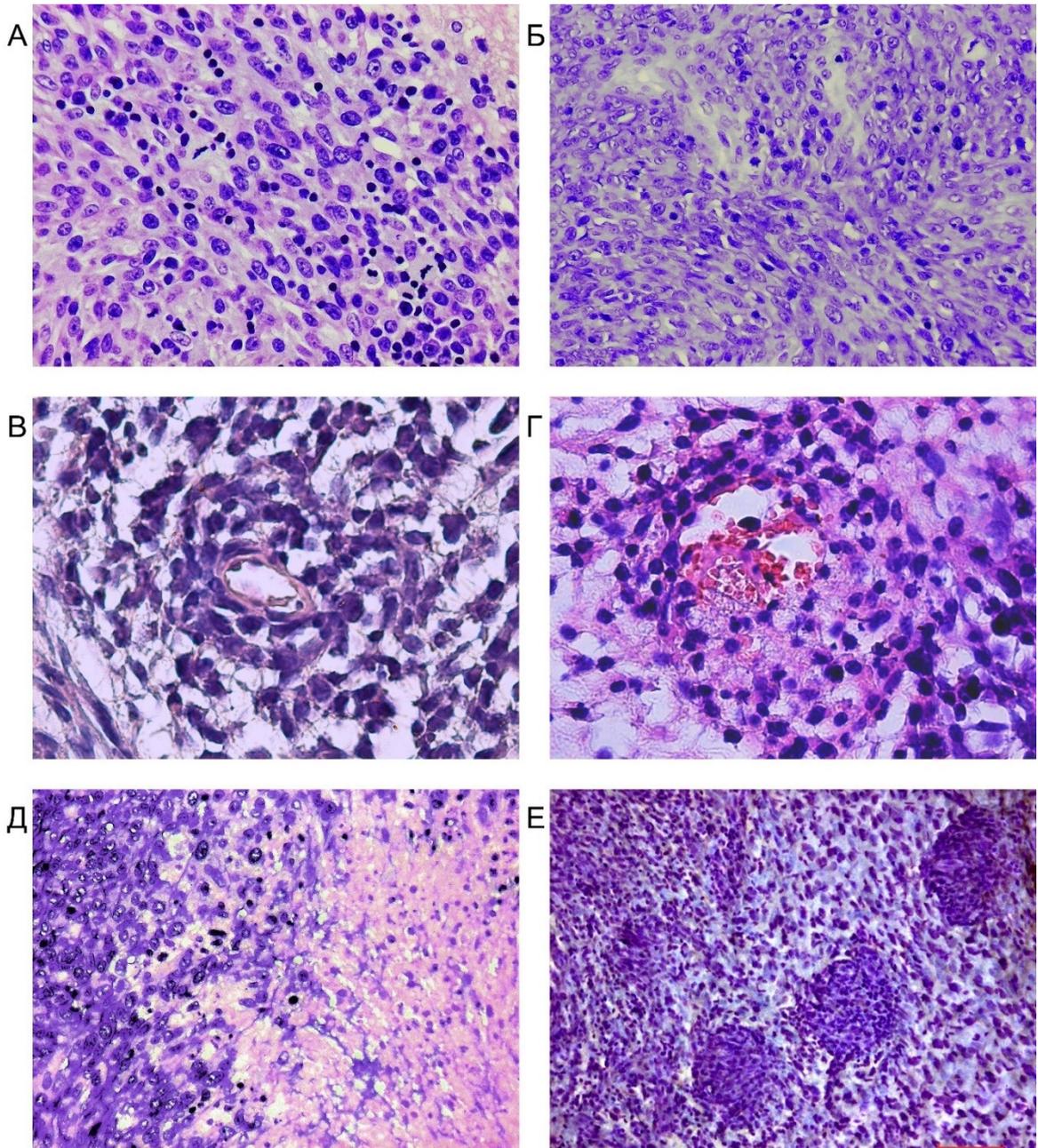


Рисунок 29 – Неопластический узел в мозге крыс с глиомой С6, 10 день наблюдений. А и Б. срезы различных частей опухолевого узла; В и Г. край опухоли и вещество мозга, содержащее неопластические клетки, сливающиеся в сателлитные очаги на удалении от первичного узла. Окраска гематоксилином и эозином

ОК были равномерно распределены в ткани опухоли, однако уже на 10 день в отдельных участках новообразования выявлялись участки разряжения (Рисунок 29 Б), отграничивающие плотные скопления ОК, из которых возникали кровеносные сосуды с признаками эластической мембраны и содержащие форменные элементы крови (Рисунок 29 В и Г). По мере движения от центра к периферии опухоли группировка неопластических клеток становилась менее плотной, достигая края узла глиомы ОК без четких границ вторгались в дисторфически измененное вещество мозга, содержащее множество ОК, распределенных между участками сухого некроза и балонной дистрофии (Рисунок 29 Д). На некотором отдалении от первичного узла возникали зоны слияния опухолевых клеток, с образованием сателлитных очагов в виде небольших «островков» (Рисунок 29 Е), окруженных многочисленными солитарными ОК.

К 28 дню морфологическая картина опухолевого процесса в мозге крыс с глиомой С6 несколько изменялась. В центре опухоли визуализировались обширные зоны некроза, (Рисунок 30 А) содержащие запустевшие кровеносные сосуды, вокруг которых были сосредоточены немногочисленные ОК, что формировало типичную для нейроэпителиальных опухолей картину «псевдорозеток». По мере удаления от зоны центрального некроза опухолевая ткань содержала множественные кровеносные сосуды (Рисунок 30 Б) и окрашивалась антителами против общего белка микроглии – *iba1* (Рисунок 30 В), антигенов CD68 и CD206, – маркеров микроглии М1 и М2 фенотипа (Рисунок 30 Г и Д), и ключевого иммуносупрессивного цитокина TGF β 1 (Рисунок 30 Е).

У животных группы ХЛТ, в ткани опухолевого узла и перитуморальной зоне к 28 дню наблюдений определялись немногочисленные скопления IBA1-ИР клеток (Рисунок 31 А и Б) с крупным телом и очень короткими отростками. Напротив, в группе животных, получивших ХЛТ+КФЗ клетки звездчатой формы, ИР в отношении IBA-1 были отгружены многочисленными, длинными сильно ветвящимися отростками. Группировка клеток была более плотной, чем в группе ХЛТ, при этом клетки были сосредоточены преимущественно в области края опухоли (Рисунок 31 В и Г).

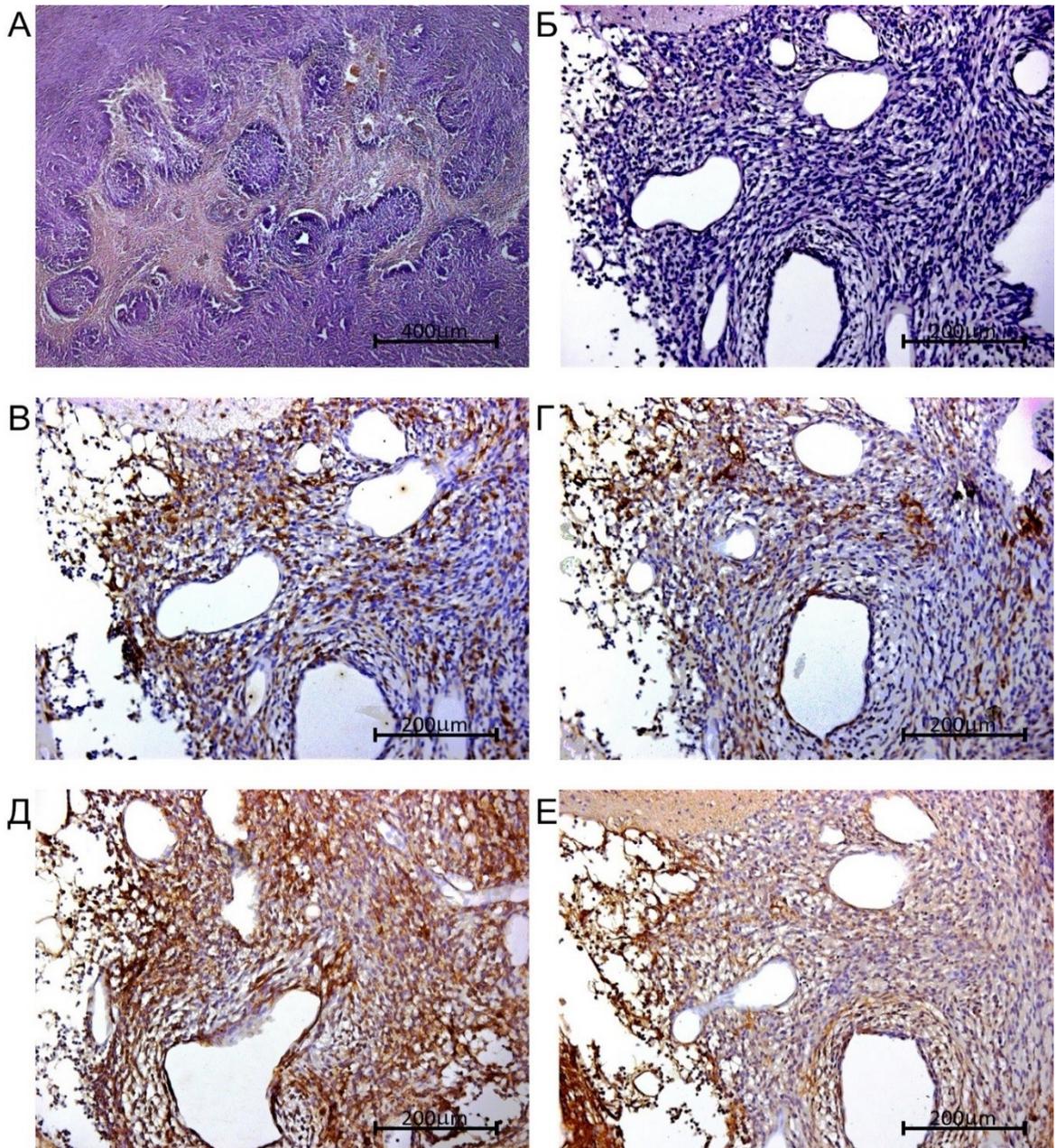


Рисунок 30 – Неопластическая ткань в мозге крыс с глиомой С6, 28 день эксперимента. Окраска гематоксилин – эозин. А. Некроз в центре узла глиомы; Б. Кровеносные сосуды в опухолевой ткани на участке между центральным некрозом и перитуморальной зоной; В-Е. тот же участок, препарат докрашен антителами против В – Iba1, Г – CD 68, Д – CD 206, Е – TGF1 β

В группах животных ОКВ+КФЗ и ДКВ+КФЗ окрашивание края опухоли антителами против IBA1 было более интенсивным, при этом IBA1 – ИР в группе ДКВ+КФЗ характеризовались более округлой формой, чем в группе ОКВ+КФЗ, с кляксообразным телом и короткими ветвящимися отростками. Клетки были плотно

сгруппированы в области края опухоли, фактически инфильтрировали перитуморальную зону и встречались на существенном удалении от опухолевого узла (Рисунок 31 Д-3).

Одновременно с увеличением содержания ИВА1-ИР клеток в ткани мозга у животных сравниваемых групп, как в области неопластического узла, так и в перитуморальной зоне, возрастало содержание клеток ИР в отношении антигена CD68, экспрессированного на поверхности моноцитов и макрофагов (Рисунок 32), что указывало на активное участие клеток красного костного мозга в опухолевом процессе.

Примечательно, что CD 68 ИР-клетки у крыс группы ХЛТ, формировали небольшие «кляксообразные» скопления (Рисунок 32 А) на границе между опухолевой тканью и веществом мозга, при этом в перитуморальной зоне встречались лишь отдельные CD68 ИР-клетки (Рисунок 32 Б). Напротив, у крыс группы ОКВ+КФЗ край неопластического узла содержал многочисленные, плотно сгруппированные CD68 -ИР элементы, окружающие многочисленные полости (Рисунок 32 В) и проникающие в перитуморальную зону, содержащую множество сателлитных ОК (Рисунок 32 Г).

Введение ДКВ в комбинации с КФЗ сопровождалась усилением интенсивности окрашивания опухолевой ткани и перитуморальной зоны антителами против CD68 (Рисунок 32 Д), которые окружали как ОК, вторгающиеся из неопластического узла в вещество мозга, так и сателлитные очаги (Рисунок 32 Е) формирующиеся в перитуморальной зоне.

Введение экспериментальным животным ДКВ в комбинации с клофазимином сопровождалось обогащением неопластического узла и перитуморальной зоны маркерами М - активированной микроглии (Рисунок 32 Ж, З).

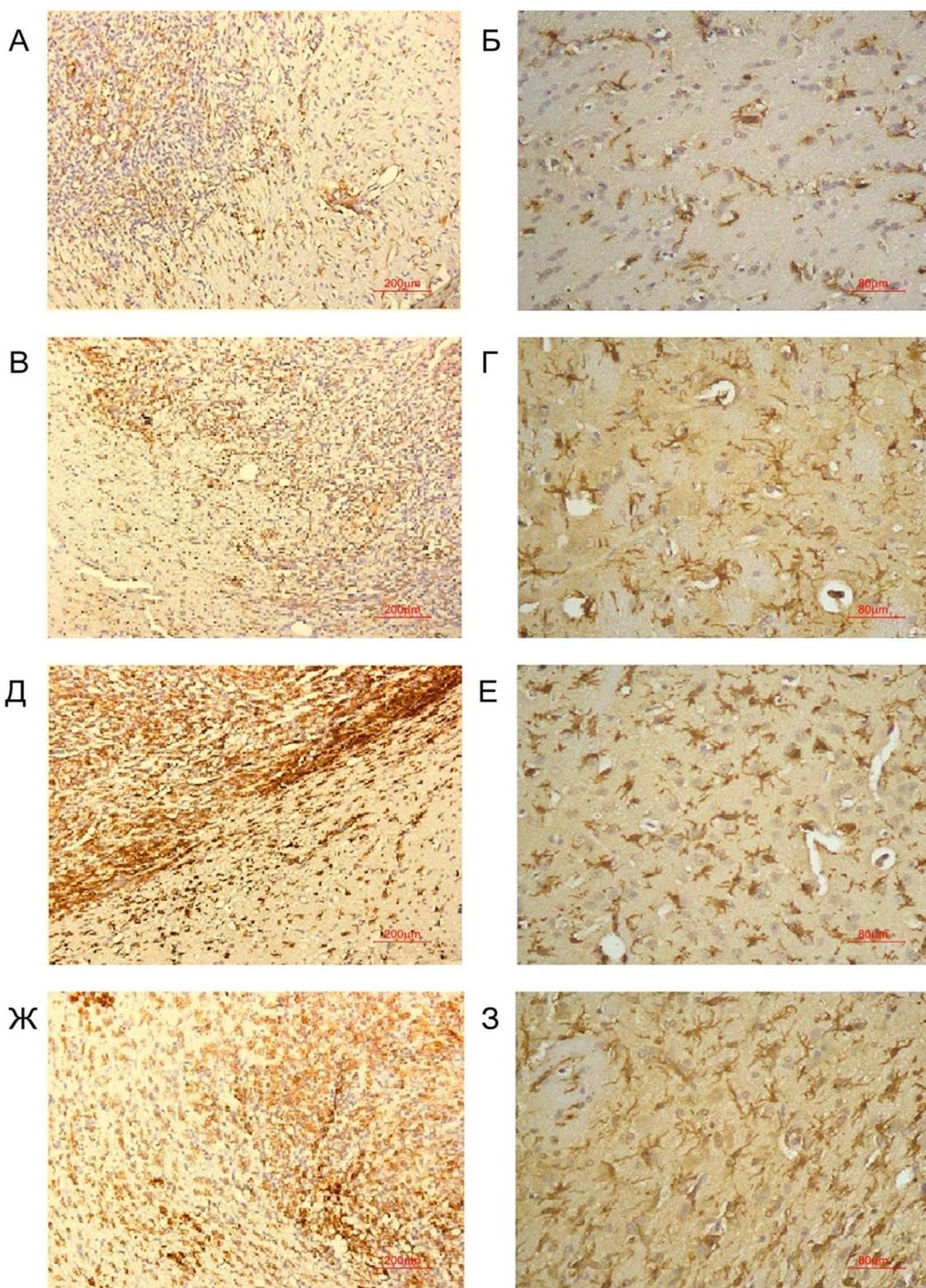


Рисунок 31 – Неопластическая ткань (левый ряд) и перитуморальная зона (правый ряд) мозге крыс с глиомой С6. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против ИВА-1, 28 день эксперимента. А, Б. группа ХЛТ; В, Г. группа ХЛТ+КФ3; Д, Е. группа ОКВ+КФ3; Ж, З. группа ДКВ+КФ3

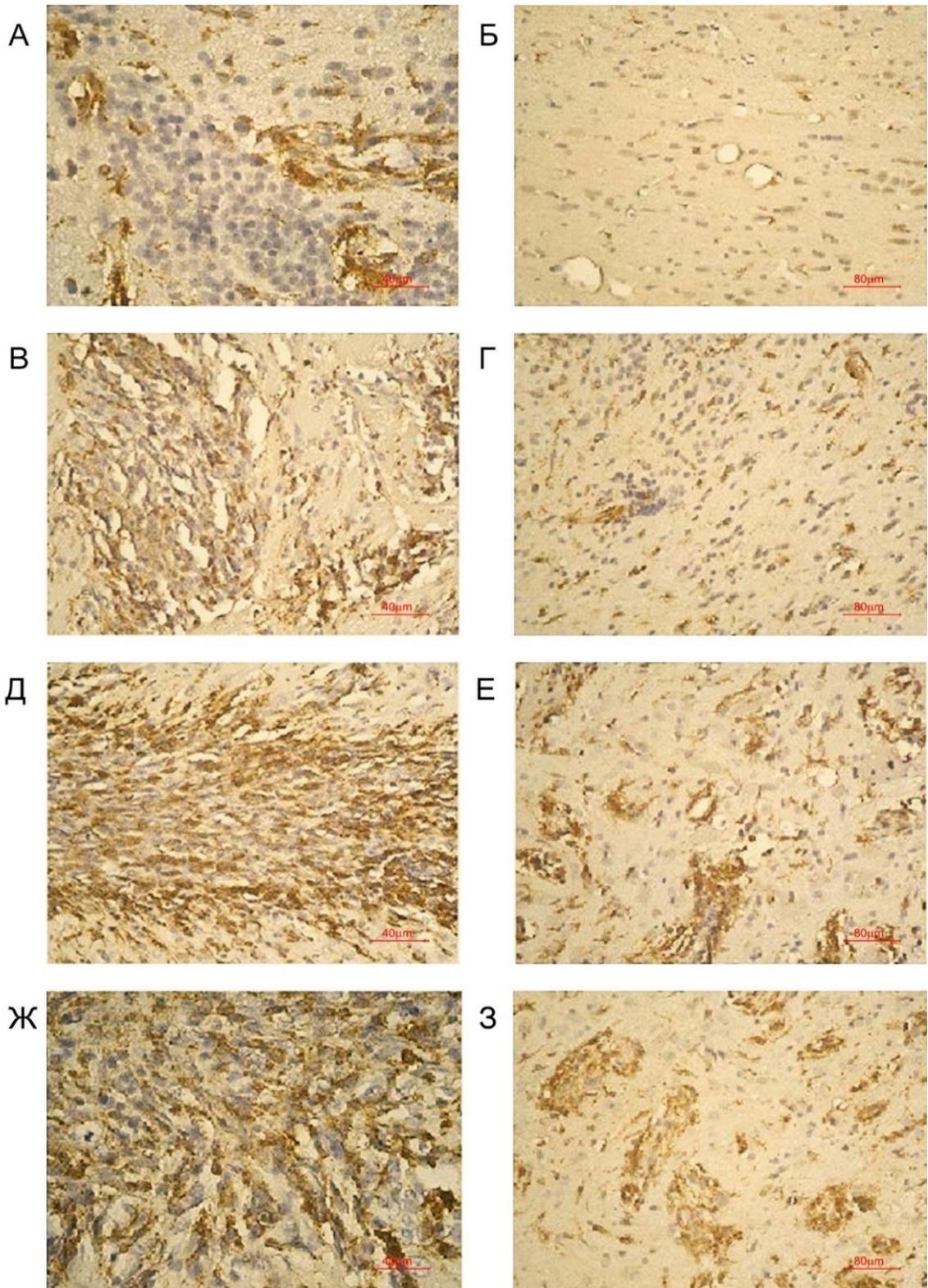


Рисунок 32 – Неопластическая ткань (левый ряд) и перитуморальная зона (правый ряд) мозге крыс с глиомой С6. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против CD68, 28 день эксперимента. А, Б. группа ХЛТ; В, Г. группа ХЛТ+КФЗ; Д, Е. группа ОКВ+КФЗ; Ж, З. группа ДКВ+КФЗ

Данные иммуногистохимического исследования были подтверждены результатами ИФА: ИТ, включающая как введение ОКВ, так и введение ДКВ в комбинации с клофазимином, сопровождается увеличением содержания микроглии в опухоли (Рисунок 33 А), воспалительной активацией микроглии (Рисунок 33 Б).

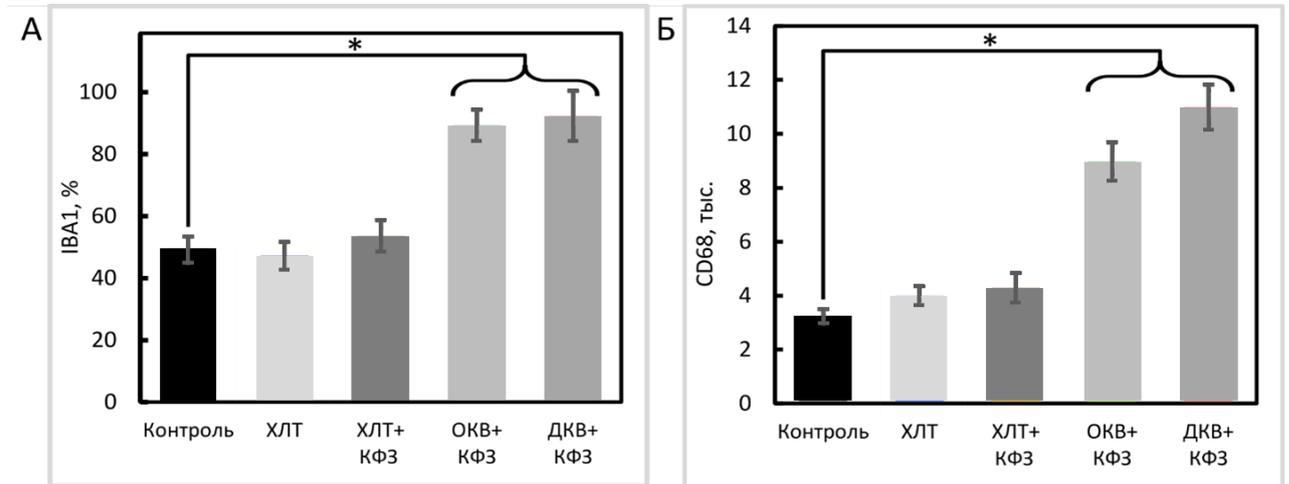


Рисунок 33 – Характеристика ткани мозга крыс с глиомой С6 по данным иммуногистохимического и иммуноферментного исследований. А. содержание клеток ИР в отношении антигена IBA1, %; Б. количество клеток ИР в отношении CD68

На препаратах мозга крысы с глиомой С6 клетки иммунореактивные в отношении одного из ключевых маркеров микроглии М2 типа локализовались преимущественно в перитуморальной зоне (Рисунок 34), где у крыс группы ХЛТ они формировали шарообразные скопления, равномерно распределенные в веществе мозга (Рисунок 34 А). У животных группы ХЛТ+КФЗ перитуморальная зона также содержала скопления CD206⁺ элементов, группировка которых была более плотной, чем у животных группы ХЛТ (Рисунок 34 Б). У крыс группы КФЗ+ОКВ картина распределения CD206⁺ клеток напоминала таковую крыс группы ХЛТ, однако клеточные элементы были распределены более равномерно (Рисунок 34 В), при этом у крыс группы КФЗ+ДКВ плотность группировки CD206⁺ клеток снижалась, появилась тенденция к их группировке в виде небольших тяжей, огибающих неопластический очаг (Рисунок 34 Г).

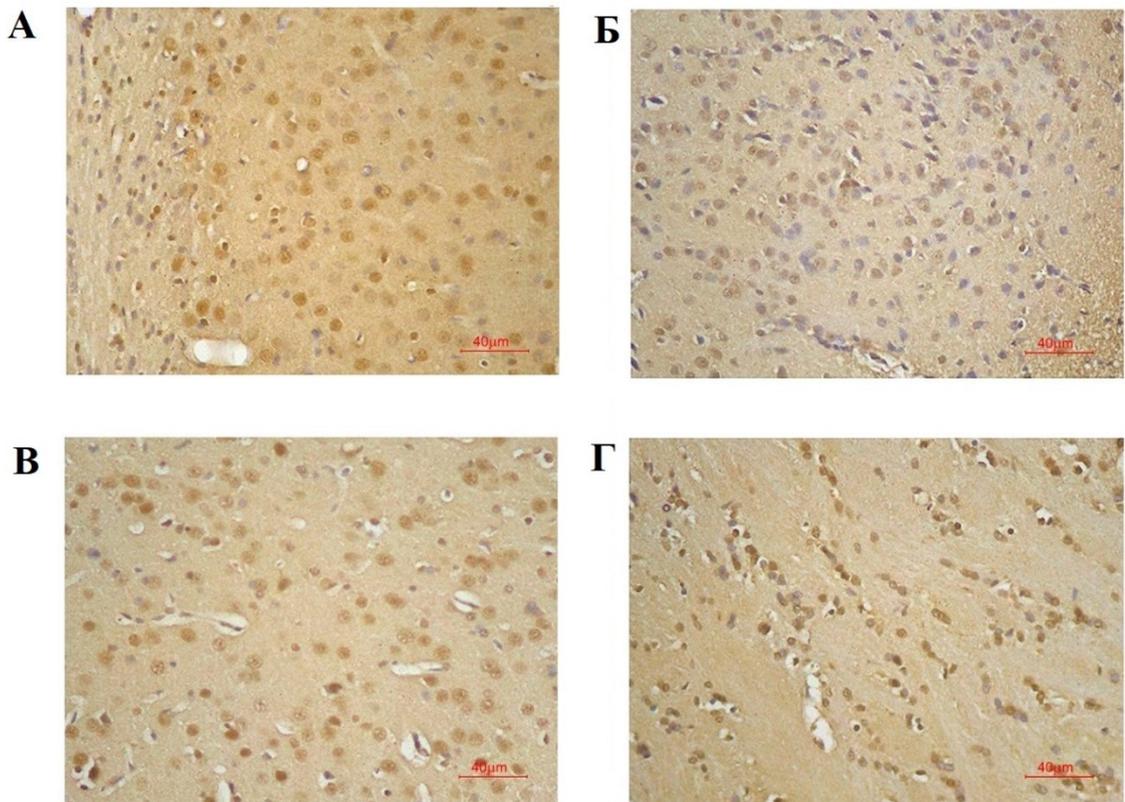


Рисунок 34 – Перитуморальная зона опухолевого узла в мозге крыс с глиомой С6. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против CD206, 28 день эксперимента. А. группа ХЛТ; Б. группа ХЛТ+КФЗ; В. группа ОКВ+КФЗ; Г. группа ДКВ+КФЗ

Иммуногистохимическое окрашивание вещества мозга антителами против TGF β 1 выявила некоторые различия в распределении этого цитокина (Рисунок 35) в области неопластического узла. У животных группы прилежащее к опухоли вещество мозга интенсивно окрашивалось антителами к TGF β ХЛТ (Рисунок 35 А). Подобная динамика сохранялась и в группе ХЛТ+КФЗ (Рисунок 35 Б), но у животных группы КФЗ+ДКВ окрашивание микропрепаратов антителами против TGF β 1 было менее интенсивным. При этом у крыс группы КФЗ+ОКВ окраска вещества мозга антителами против TGF β 1 была менее интенсивной, что соответствовало картине морфологических трансформаций, наблюдаемых у животных данной группы на рисунке 35.

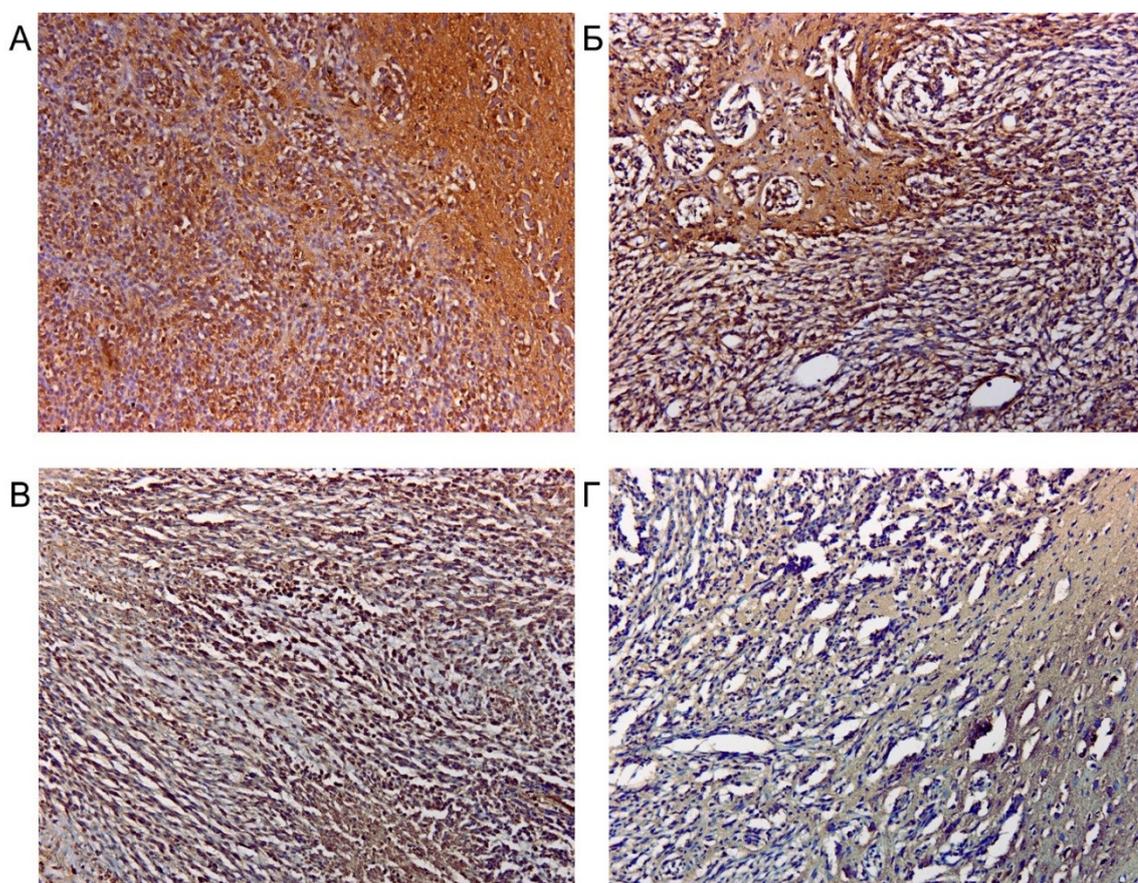


Рисунок 35 – Край опухолевого узла в мозге крыс с глиомой С6. Окраска гематоксилин - эозин. Препарат дополнительно окрашен антителами против TGF1 β . А. группа ХЛТ; Б. группа ХЛТ+КФЗ; В. КФЗ+ОКВ; Г. КФЗ+ДКВ

3.5.3 Оценка содержания β -катенина в опухолевой ткани по данным иммуногистохимического и иммуноферментного анализа

По данным иммуногистохимического анализа распределение β -катенина в опухолевой ткани у животных различных групп было не равномерным (Рисунок 36).

Препараты опухолевой ткани из мозга крыс контрольной группы более интенсивно окрашивались антителами против β -катенина к 28 дню эксперимента (Рисунок 36 А и Б). На препаратах ткани мозга из группы животных получивших ХЛТ, клетки ИР в отношении β -катенина к 28 дню были сосредоточены кластерно, обнаруживая зоны более интенсивного окрашивания, что вероятно указывало на особую роль этого белка в процессах адаптации к ХЛТ, а не только его присутствие в ОК (Рисунок 36 В и Г). Препараты опухолевой ткани из мозга крыс группы ХЛТ

+КФЗ на 14 день значимо не отличались от контроля, однако к 28 дню наблюдений, клетки, ИР в отношении этого белка практически отсутствовали в поле зрения и были в виде узкой каймы распределены вдоль границ опухоли (Рисунок 36 Д и Е).

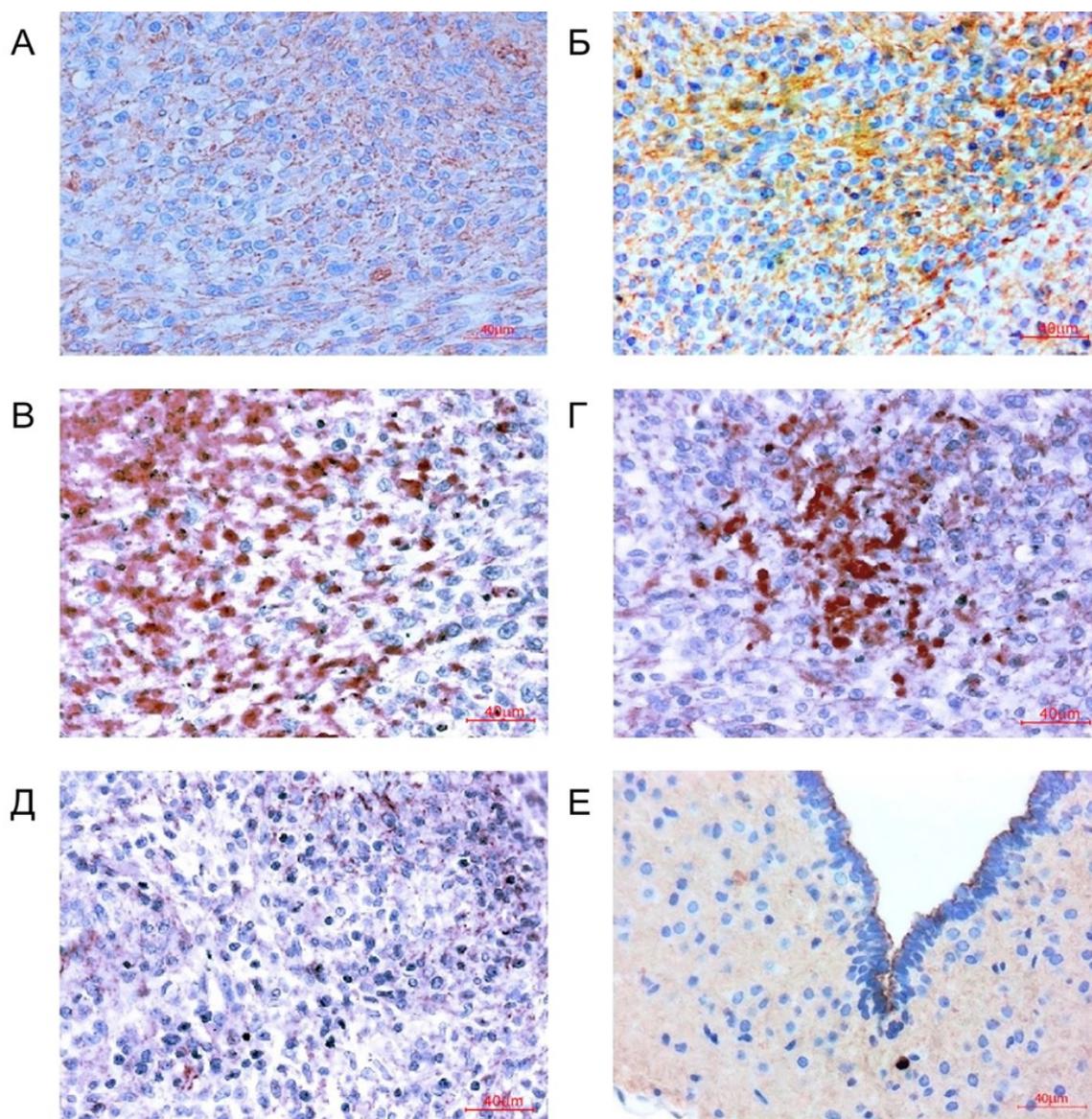


Рисунок 36 – Неопластическая ткань в головном мозге крыс с глиомой С6. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против β -катенина, 28 день эксперимента. А, Б. группа контроль; В, Г. группа ХЛТ; Д, Е. группа ХЛТ+КФЗ

Препараты опухолевой ткани из мозга крыс группы ОКВ+КФЗ на 28 день значимо не отличались от ДКВ+КФЗ, при этом клетки, ИР в отношении β -катенина практически отсутствовали в поле зрения (Рисунок 37 А-Г).

По данным ИФА ИТ, включающая как введение ОКВ, так и введение ДКВ в комбинации с клофазимином, сопровождается уменьшением содержания β -катенина в ткани мозга (Рисунок 38).

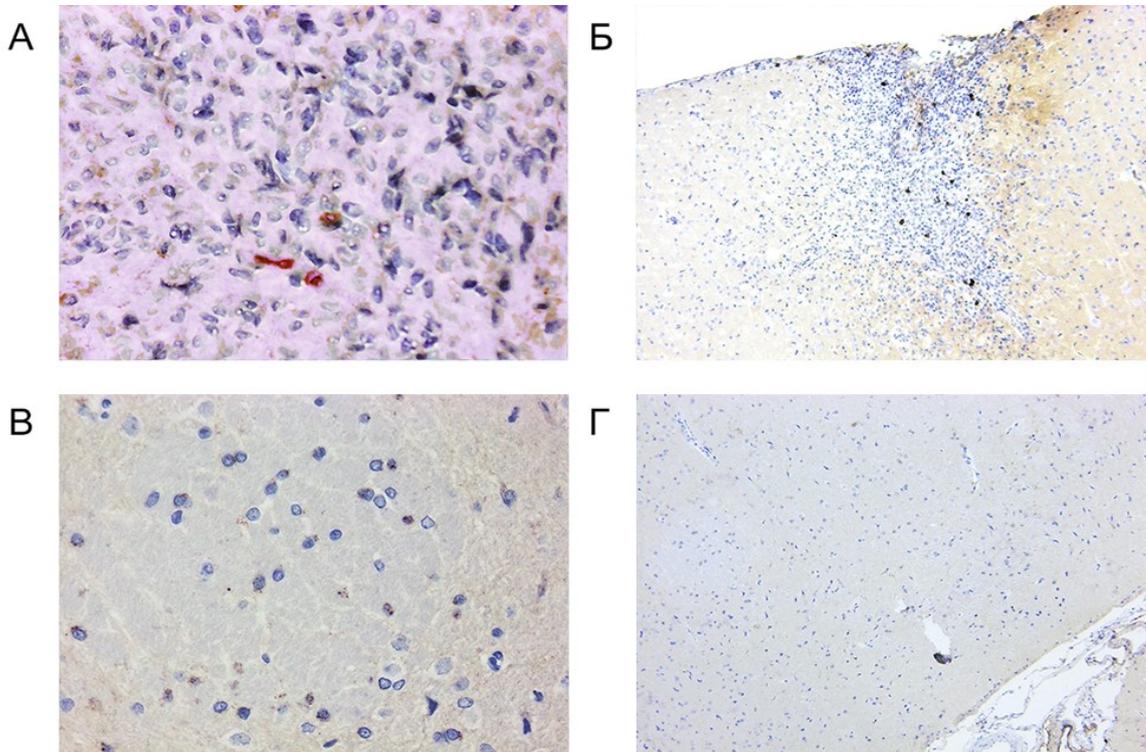


Рисунок 37 – Неопластическая ткань в головном мозге крыс с глиомой С6. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против β - катенина, 28 день эксперимента. А, Б. группа ОКВ+КФЗ; В, Г. группа ДКВ+КФЗ

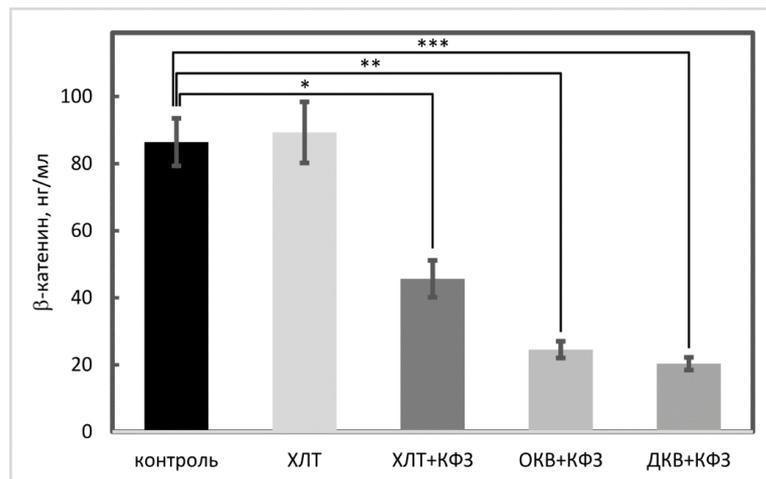


Рисунок 38 – Результаты иммуноферментного анализа ткани мозга крыс с глиомой С6 на содержание β -катенина. По оси ОХ – экспериментальные группы, в качестве контроля использовали групп с привитой глиомой без лечения. По оси ОУ – количество β -катенина нг/мкл.

3.6 Выживаемость экспериментальных животных

Медиана выживаемости экспериментальных животных контрольной группы составила $24,5 \pm 2,5$ дня, группы ХЛТ – 45 ± 5 дня (Рисунок 39), а группы ХЛТ+КФЗ – 60 ± 12 дней. Медиана выживаемости крыс, получивших ОКВ совместно с клофазимином, была достоверно больше и составила $76,5 \pm 6,5$ дня, что указывает на стратегически важную роль ИТ в лечении ГБ. При этом заслуживает особого внимания, что у животных группы ДКВ+КФЗ медиана выживаемости была максимальной и составила 90 ± 7 дня.

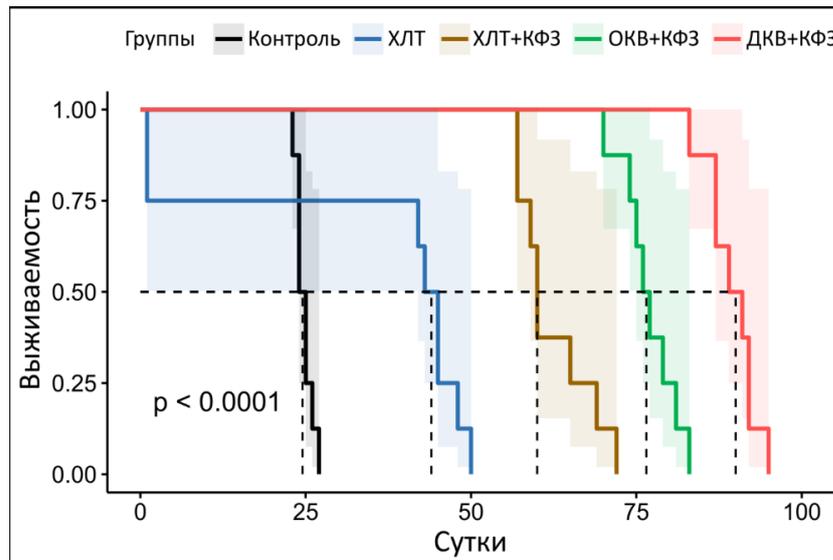


Рисунок 39 – Выживаемость животных экспериментальных групп по Каплану-Майеру

Таким образом, исследование позволяет сделать вывод: введение опухолево-клеточной (ОКВ) и дендритно-клеточной вакцины (ДКВ) в организм животных с глиомой С6 в комбинации с клофазимином сопровождается усилением противоопухолевого иммунного ответа, в виде развития локальной воспалительной реакции, увеличения содержания интерлейкина 1β и 18 в сыворотке крови, увеличением содержания $IBA1^+$, $CD68^+$ провоспалительно активированной микроглии в опухолевой ткани. Комбинированное использование ДКВ и клофазимина сопровождается максимальной выживаемостью экспериментальных животных 90 ± 7 дней против 45 ± 5 дней в группе ХЛТ.

ГЛАВА 4 ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНТИГЛИОМНОГО ДЕЙСТВИЯ КЛОФАЗИМИНА ПРИ ИММУНОТЕРАПИИ (Обсуждение полученных результатов)

Рак – глобальный вызов для человечества. Несмотря на все достижения науки рак остается второй из ведущих причин смерти людей во всех странах мира. По данным ВОЗ, только в 2020 году от рака умерло более десяти миллионов человек и число онкологических больных продолжает расти, что требует всесторонней консолидации усилий мирового сообщества для борьбы с этой экзистенциальной угрозой.

Безусловно, по сравнению с наиболее распространенными, социально - значимыми формами злокачественных новообразований, среди которых рак молочной железы, легких, толстой кишки и предстательной железы, число случаев ГБ не велико. Однако без преувеличения, ГБ является одним из самых смертоносных онкологических заболеваний, эффективность лечения которого позволяют объективно оценить результативность усилий всего человечества в отношении решения проблемы рака в целом. В этой связи даже небольшой успех в лечении ГБ является значимым для медицинской науки.

Нельзя не отметить, что до середины XX-го века эта проблема вообще не имела решения. Системное развитие нейроонкологии стало возможным с изобретением магнитно-резонансной томографии и появлению ТМЗ в 70-х годах XX-го века. Применение этого лекарственного препарата обеспечило выживаемость большинства больных ГБ в течение года, и в какой-то момент было совершенно очевидно, что комбинация ТМЗ с другими цитостатиками приведет к большему увеличению выживаемости больных.

Тем не менее подавляющее большинство лекарств, предложенных для комбинации с ТМЗ, несмотря на многомиллионные инвестиции не оправдали возложенных ожиданий. Сегодня, как и 50 лет назад, средняя выживаемости больных ГБ составляет 15 мес, и несмотря на весь арсенал лекарственных средств,

основным препаратом, способным продлить жизни больному, по-прежнему является ТМЗ.

Существующий подход к лечению ГБ часто называют «агрессивным», поскольку он предусматривает не только высокие дозы облучения, но эскалацию дозы химиотерапевтических средств до уровня, конкурирующего с тяжестью основного заболевания, и представляет прямую угрозу для жизни больного. Отсутствие результата от агрессивных режимов применения ТМЗ, ломустина, бевацизумаба и новых молекулярно-нацеленных лекарственных средств, стимулировало интерес к изучению механизмов адаптации живых систем к агрессивному воздействию цитостатиков, что вывело на первое место проблему регуляции ОСК. Однако попытки решения этой проблемы путем комбинации цитостатиков и таргетных средств пока не привели к очевидному успеху, что требует некоторого переосмысления существующих подходов к этой проблеме.

Результаты настоящего исследования позволяют утверждать, что для эффективного воздействия на ОСК нужна стратегия, предусматривающая регуляцию внутренних и внешних механизмов пластичности, что возможно с использованием комбинации клофазимина и иммунотерапии.

4.1 Обсуждение результатов иммуноцитохимической характеристики ОК, используемых в эксперименте

4.1.1 Обсуждение результатов иммунофенотипирования клеток ГБ с индуцированной резистентностью к темозоломиду

В основу нашего эксперимента положено моделирование классической клинической ситуации, в которой систематическое применение ТМЗ ведет к снижению его антиглиомной эффективности. В этой связи особенно важно, что ГБ – гетерогенная опухоль, по этой причине в нашем эксперименте использованы три различные линии ОК – С6, U87MG и T98G. Глиома С6 – это самая востребованная линия ОК, используемая для моделирования процессов роста и инвазии ГБ [97] у иммунокомпетентных животных. Данная модель не только воспроизводит

основные патофизиологические механизмы развития ГБ, но и открывает возможности для проведения клинико- морфологических корреляций между неврологическим и соматическим статусом животного.

В свою очередь, клетки коммерческой линии U87MG глиобластомы несколько отличаются от аутентичного оригинала, полученного в университете Уппсалы, однако представляют собой одну из самых известных моделей *idh*-дикого типа ГБ с низким статусом метилирования гена *mgmt*, обладают очень высокой пластичностью и используются для изучения противоопухолевого действия лекарственных средств [41]. Клетки ГБ линии T98G характеризуется повышенной экспрессией базовых генов, характерных для примитивных опухолей нейроэктодермального ряда [186] и изначально обладают довольно высокой резистентностью к цитотоксическим препаратам [161]. Представленные аргументы позволяют утверждать, что в эксперименте воспроизведена мультиформность – как главное свойство ГБ, клетки которой по-разному реагируют на химиотерапевтическое воздействие.

Как следует из эксперимента, используемые линии глиальных опухолей изначально обладали сопоставимым числом пролиферирующих ОК (Таблица 4), при этом предобработка ТМЗ сопровождалась снижением числа PCNA+ ОК линии С6 в 3,9 раза, с $54,2 \pm 2,3$ до $13,7 \pm 1,5\%$, а ОК линии U87 в 2,4 раз, с $45,7 \pm 3,5$ до $18,3 \pm 1,1\%$. В культуре ОК линии T98G количество PCNA+ клеток тоже снижалось в 2,4 раза, с $50,7 \pm 5,3$ до $20,5 \pm 2,2\%$, что довольно наглядно иллюстрирует типичный ответ ГБ на химиотерапию, однако последующие различия в ответе различных клеточных линий на ХТ связаны с наличием в составе их клеточной популяции ОСК.

Как следует из эксперимента (Таблица 4) популяции клеток глиомы С6 и U87MG характеризовалась наличием ОСК иммунофенотипа CD133⁺ ($4,2 \pm 1,5\%$ и $4,1 \pm 1,8\%$) – описанных *Daniel Brown* [59, 60] как особый, пронеуральный субтип ОСК. Примечательно, что число ОК этого фенотипа в клетках линии T98G изначально было довольно велико, и составляло $90,2 \pm 8,5\%$. Систематическая обработка ТМЗ сопровождалась увеличением их количества в культуре ОК линии

С6 и U87MG в 3 раза, до $12,7 \pm 2,8\%$, а в культуре ОК линии С6, и до $15,5 \pm 4,2\%$ в культуре ОК линии U87MG. Примечательно, что число пролиферирующих ОК и $CD133^+$ элементов в культуре клеток ГБ с индуцированной резистентностью к TMZ оказывается сопоставимым, что позволяет утверждать, что в данном случае пролиферация связана именно с ОСК. Однако количество ОК иммунофенотипа $CD133^+$ в культуре ОК линии T98G значимо не изменилось и составляло $92,9 \pm 1,4\%$, однако количество $PCNA^+$ ОК снизилось в 2,5 раза, что еще более наглядно иллюстрирует феномен разновекторного ответа ОК на химиотерапию и служит аргументом в пользу утверждения *Christoph & Dagmar Beier* [50], что феномен ОСК, как наиболее химиорезистентных ОК, непосредственно не связан только с неопластическими клетками $CD133^+$ иммунофенотипа.

Количество ОК иммунореактивных в отношении антигена CD44, – описанных *Daniel Brown* как ОСК мезенхимального фенотипа [60], в культуре контрольных ОК глиомы С6 составляло $25,6 \pm 3,5\%$, что, фактически, было сопоставимо с таковым в культуре ОК линии U87 – $35,9 \pm 3,96\%$, но уступало их числу в культуре клеток ГБ линии T98G – $52,9 \pm 6,3\%$. Как известно, соотношение пронеуральных и мезенхимальных антигенов ОСК [89, 116] коррелирует с агрессивностью опухоли, степенью гетерогенности ее клеточной популяции и чувствительностью к ХЛТ. Как следует из эксперимента, синхронно с увеличением числа элементов иммунореактивных по CD133 антигену, в культуре ОК линии С6 и U87MG число $CD44^+$ элементов возросло в 2 раза, до $57,1 \pm 4,8\%$ и $63,2 \pm 5,7\%$. Одновременно, в культуре ОК линии T98G число $CD44^+$ иммунопозитивных элементов возросло до $71,3 \pm 5,2\%$.

Именно тут уместно повторное обращение к работам *Daniel Brown* [59] в которых одновременное увеличение числа $CD133$ и $CD44$ клеток, автор связывает как селекцией особого субтипа $CD44^+ CD133^+$ ОК, так и запуском в ОК процесса эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), который сопровождается усилением подвижности и уменьшением степени дифференцировки ОК.

Отталкиваясь от работ *Cyril Nefel* [165], допустимо предположить, что такое мезенхимальноподобное фенотипическое состояние характеризуется селекцией ОК

с амплификацией гена *nfl*, в гораздо большей степени, чем генов семейства *egfr*, *cdk* и *pdgfr* ассоциированных с геномными характеристиками состояний иных фенотипов. Однако анализ генетических карт не входил в число задач исследования. Представляется существенно более важным, что в нашей работе идентифицирована связь между нарастанием химиорезистентности и процессами эпителиально-мезенхимального (ЭМП) играющего важнейшую роль в патогенезе ГБ. Безусловно, применительно к нейроэктодермальным опухолям более уместен термин пронеурально – мезенхимальный переход, однако оба термина используются в нашей работе как синонимы процесса усиления пластичности ОК, сопровождающийся существенным снижением степени дифференцировки ОК [96] и преобладанием мезенхимального субтипа ОСК в компартменте стволовых клеток [124].

В пользу снижения степени дифференцировки ОК свидетельствует не только увеличение $CD133^+$ и $CD44^+$ ОСК, но и уменьшение числа элементов, реактивных в отношении маркера астроцитов - глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), которое в культуре ОК линии С6 уменьшилось с $9,5 \pm 2,1$ до $3,5 \pm 1,2\%$, в культуре ОК линии U87MG снизилось с $11,5 \pm 2,5$ до $8,8 \pm 5,2\%$. При этом снижение числа $GFAP^+$ ОК линии T98G было еще менее заметным, их число уменьшилось с $3,4 \pm 2,2$ до $2,5 \pm 3,2$, что не является достоверным, но в определенной степени тоже соответствует описанной выше тенденции.

Увеличение содержания $CD133^+$ элементов является одной из важнейших характеристик ЭМП ведущего к обогащению пула ОСК, в пользу чего указывает увеличение содержания в клеточной культуре числа элементов иммунопозитивных в отношении β -катенина. Вероятно, базовый уровень этого белка характеризует потенциальную степень пластичности ОК и резистентности к химиотерапии. В нашем эксперименте количество ОК реактивных в отношении β -катенина возросло с $25,8 \pm 1,9\%$ до $56,7 \pm 2,3\%$ в культуре ОК линии С6, с $28,1 \pm 1,76\%$ до $44,4 \pm 4,5\%$ в культуре ОК линии U87MG, и с $32,6 \pm 1,1\%$ до $49,6 \pm 3,7\%$ в культуре ОК линии T98G. Увеличение содержания β -катенина в ОК подтверждалось данными вестерн-блоттинга (Рисунок 2) и результатами ПЦР с обратной транскрипцией (Рисунок 3).

Использование трех методов, подтверждающих прямую связь между уровнем β -катенина и резистентностью к ТМЗ, обусловлено значимостью β -катенина как потенциального маркера стволовых клеток, и разночтениями в существующих подходах к оценке содержания этого протеина. Например, в работах *Datong Sun* [77], члена научной группы *Ke Xu* [121] для оценки уровня содержания β -катенина в клетках линии U87MG используется метод трансфекции клеток ГБ лентивирусной конструкцией, содержащей мРНК данного протеина, с последующей оценкой IC_{50} в отношении ТМЗ. В работах данной научной группы подчеркивается связь между резистентностью к ТМЗ и уровнем β -катенина в ОК, однако для более объективной оценки результатов такого исследования целесообразнее использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии – масс спектрометрии с биоинформационным анализом.

В другом исследовании, *Yang Wang* [231] модулирует активацию сигнального пути wnt / β -катенин в ОК путем нокаута гена *ube2t* с использованием микроРНК и цитомегаловирусных конструкций. В свою очередь, *Yan Lu* [229], *Eun-Jin Yun* [239], *Cheng-Yu Tsai* [207] и некоторые другие авторы, использующие методы непосредственного вмешательства в геном ОК, отмечают связь между уровнем β -катенина и резистентностью ОК к ТМЗ. Между тем на прямую связь между ОСК и уровнем β -катенина сотрудниками нашей лаборатории было указано в 2019 г [195], что нашло подтверждение в последующих исследованиях 2020 года [196]. *Amir Behrooz* и *Amir Syahir* в одной из работ 2021 г [49] признали полученные нами результаты одним из важнейших аргументов в пользу прямой связи между β -катенином и свойствами ОСК. Традиционно, в своих исследованиях мы использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию, при планировании эксперимента мы отказались от использования данного метода, как и методов вмешательства в геном, однако используемая нами в данном исследовании комбинация методик позволили получить более корректные результаты.

Увеличение уровня β -катенина в нашем исследовании сопровождается более чем двукратным увеличением содержания в культуре ОК реактивных в отношении

миграционного N-кадгерина в культурах ОК. В культурах клеток линии С6 и U87 их количество возрастает с $17,9 \pm 1,3$ до $35,8 \pm 3,5\%$, и с $32,6 \pm 2,8$ до $42,4 \pm 1,2\%$. Увеличение числа ОК иммунореактивных в отношении N-кадгерина в структуре клеток линии T98G с $36,4 \pm 1,3$ до $58,6 \pm 5,1\%$, также указывает на высокую способность к трансформации под воздействием ТМЗ, несмотря на большую устойчивость к данному препарату.

Нельзя не заметить, что в ОК этой по мере инкубации в присутствии ТМЗ значительно снижается число элементов иммунореактивных в отношении адгезионного E-кадгерина с $31,2 \pm 4,6$ до $21,9 \pm 2,1\%$, в культуре ОК линии С6, с $36,5 \pm 3,7$ до $22,1 \pm 1,3\%$ в культуре ОК линии U87MG, и с $52,1 \pm 0,9$ до $49,4 \pm 1,7\%$ в культуре ОК линии T98G. Данное обстоятельство позволяет обоснованно утверждать, что увеличение содержания β -катенина в ОК с индуцированной резистентностью с ТМЗ обусловлено процессом ЭМП формирующему особый мезенхимальный фенотип ОК.

4.1.2 Обсуждение результатов иммуноцитохимической характеристики клеток костного мозга крысы

В нашем эксперименте использована дендритно-клеточная вакцина [4], однако исходным сырьем являлся не лейкоконцентрат мононуклеаров, получаемый из кровеносного русла больного при стимуляции Г-КСФ, а клетки костного мозга, выделяемые из длинных трубчатых костей здорового сиблинга. Применительно к цели эксперимента этот подход имеет ряд стратегических преимуществ. Во-первых, используется ткань, содержащая в своем составе большое количество кроветворных стволовых клеток, прогениторов миелоидного и лимфоидного ряда и иммунцитов. Во-вторых, это клетки здорового животного, не подвергавшиеся систематическому влиянию множества репрограммирующих факторов, продуцируемых ОК, и не истощенные воздействием химиолучевой терапии и глюкокортикостероидов.

Как следует из эксперимента содержание клеток иммунореактивных в отношении общелейкоцитарного антигена CD45 при культивировании в среде,

содержащей ИЛ4 и ГМ-КСФ возросло практически вдвое с $43,3 \pm 3,3\%$ до $82,3 \pm 4,2\%$, при этом добавление иммунологического адьюванта сопровождалось увеличением количества макрофагов воспалительного типа в 4,8 раза – с $13,4 \pm 3,2$ до $65,4 \pm 3,2\%$ и дендритных клеток в 6,5 раз с $11,5 \pm 4,3$ до $75,5 \pm 5,3\%$.

Общеизвестно, что ГМ-КСФ рекрутирует клетки костного мозга из депо в костном мозге в кровеносное русло, что сопровождается частичной дифференцировкой миелоидных предшественников в гранулоцитарном и моноцитарном направлении. В свою очередь интерлейкин 4 регулирует процессы пролиферации лимфоидных предшественников. В свете сказанного закономерным выглядит синхронное с ростом популяции провоспалительных макрофагов увеличение количества дендритных клеток (ДК), имеющие как миелоидное, так и лимфоидное происхождение.

Активация культуры клеток иммунологическим адьювантом является безусловным стимулом к провоспалительной активации, фагоцитозу антигена, продукции провоспалительных цитокинов и пролиферации. В нашей работе в качестве иммунологического адьюванта использованы клетки глиомы линии С6, которые лизировали путем многократного замораживания и размораживания, согласно методике, описанной *Ириной Александровной Балдуевой* с соавторами [4]. Безусловно, такой подход довольно схематичен, но в контексте задач данного этапа эксперимента вполне оправдан.

M1-активированные макрофаги и дендритные клетки продуцируют множество провоспалительных цитокинов, а также множество микровезикул содержащих противоопухолевые микроРНК, среди которых описаны – miR-200a угнетающая экспрессию гена MGMT [52] и тем самым способствуя усилению антиглиомной активности TMZ, miR-34 – нокаутирующую гены pd-1 [74] и pdgfra [197], miR-514a-3 – подавляющая процесс эпителиально-мезенхимального перехода, экспрессию ген *egf* и угнетает другие, в том числе *wnt*-зависимые молекулярные механизмы, miR-224 – угнетает экспрессию генов группы *hif* [108], что резко снижает адаптивные возможности ОК, их толерантности к гипоксии и ионизирующему излучению [208]. Экзосомы, продуцируемые провоспалительно

активированными макрофагами и дендритными клетками, содержат сигнальные белки, активирующие внутриклеточные сигнальные пути апоптоза и индуцирующие каспаза-опосредованный иммунный ответ [156, 184]. Однако список на этом далеко не исчерпан.

4.2 Обсуждение влияние клофазимина на клетки глиобластомы *in vitro*

4.2.1 Обсуждение влияние клофазимина на подвижность клеток ГБ в тесте заращения царапины в клеточном монослое

Как следует из эксперимента время заращения царапины в клеточном монослое в контрольных культурах ОК варьировало в небольших пределах: от $55,3 \pm 3,3$ ч – для ОК линии U87MG до $61,4 \pm 3,2$ ч – для ОК линии С6, что во- первых, положительно характеризует используемую модель *in vitro*, свидетельствует о высокой подвижности и инвазивной активности ОК (Рисунок 7).

Под влиянием тестируемых препаратов время заращения царапины в клеточном монослое увеличивалось, что указывает на снижение подвижности ОК. Этот эффект был наиболее выражен у КФЗ, который в концентрации 10 мкмоль/л увеличивал время заращения царапины в культуре клеток линии С6 до $79,2 \pm 4,5$ ч. Целекоксиб также снижал подвижность ОК линии С6 (Рисунок 7 А), однако, эффективность целекоксиба в концентрации 250 мкмоль/л была сопоставима с эффективностью 10 мкМ клофазимина, антимиграционный эффект которого усиливался с ростом концентрации от 50 до 250 мкмоль/л.

В культуре ОК линии U87MG сохранялся цитостатический эффект КФЗ (Рисунок 7 Б). Примечательно, в отличие от линии С6, целекоксиб в концентрации 250 мкмоль/л несколько превосходил антимиграционное действие 10 мкмоль/л КФЗ (Рисунок 7 Б), однако был сопоставим с подобным эффектом 50 мкмоль/л КФЗ. Дальнейшее увеличение концентрации оказывало эффект аналогичный наблюдаемому при тестировании КФЗ в отношении линии С6. Заслуживает также внимания тот факт, что в отношении клеток линии U87MG никлозамид практически не подавлял подвижность ОК и не вызывал цитостатического

эффекта, наблюдаемого при высоких концентрациях препарата в отношении линии С6.

Особо отметим, что в отношении ОК линии Т98G целекоксиб не менее эффективно чем КФЗ подавлял подвижность неопластических клеток в тесте заращения царапины (Рисунок 7 В), при этом антимиграционное действие 250 мкмоль/л КФЗ было сопоставимо с 50 мкмоль/л никлозамида. Столь разноплановый ответ стандартизованных линий ОК, изначально обладающих практически сопоставимой миграционной активностью, наглядно характеризует трудности фармакотерапии ГБ и однозначно указывает, что экспериментальные модели, используемые в нашем эксперименте, соответствуют клинической реальности и воспроизводит эффект мультиформной – важнейшее свойство ГБ.

Особого внимания заслуживает усиление цитостатического действия КФЗ в отношении ОК с индуцированной резистентностью к ТМЗ (Рисунок 8). В интактной культуре ОК линии Т98G с индуцированной резистентностью к ТМЗ время заращения царапины составило $85,25 \pm 5,3$ ч, против $61,1 \pm 2,3$ ч в культуре контрольных ОК (Рисунок 8 А), что позволяет обоснованно утверждать, что фармакорезистентные ОК достоверно были более подвижными.

Под влиянием перепрофилируемых препаратов подвижность фармакорезистентных ОК снижалась более выражено по сравнению с интактной культурой, что проявлялось увеличением времени заращения царапины в клеточном монослое. Данный эффект был наиболее выражен у КФЗ, который в концентрации 10 мкмоль/л увеличивал время заращения царапины в культуре клеток до $120,45 \pm 13,7$ ч, что было достоверно как по сравнению с интактной фармакорезистентной культурой ($85,25 \pm 5,3$ ч), так и превосходило действие КФЗ на интактные ОК (Рисунок 8 А). Наблюдаемый эффект усиливался с ростом концентрации КФЗ до 50 мкмоль/л, дальнейшее увеличение концентрации препарата сопровождалось развитием цитотоксического эффекта.

Цитостатическое действие КФЗ объясняется влиянием на сигнальный путь *Wnt*, на что указывает усиление подвижности фармакорезистентных ОК при стимуляции wnt-лигандами. При обработке ОК Wnt3A белком подвижность резко

возрастала по сравнению с интактным контролем, время заращения царапины составило $72,5 \pm 6,5$ ч против $137,5 \pm 4,0$ ч (Рисунок 8 Б). Клофазимин в концентрации 50 мкмоль/л существенно снижал подвижность фармакорезистентных ОК, данный параметр составил $196,4 \pm 14,5$ ч, что делало эти различия более наглядными. Результаты эксперимента указывают на наличие у КФЗ дозозависимого антиметастатического действия, более выраженного в отношении ОК с фенотипом ЭМП.

4.2.2 Обсуждение цитотоксического действие клофазимина в отношении клеток различных линий глиобластомы

Как следует из эксперимента, в концентрации $37,6 \pm 3,2$ мкмоль/л противолепрозный препарат КФЗ за 24 часа наблюдений вызывал гибель 50% клеток глиомы С6 (Рисунок 9), при этом IC_{50} КФЗ для клеток линии U87MG и T98G составила $29,0 \pm 1,3$ и $38,3 \pm 4,1$ мкмоль/л, соответственно (Рисунок 10 А и Б). Допустимо предположить, что такое различие полулетальных доз в первую очередь объясняется присутствием в составе популяции ОК линий С6 большого числа CD 133⁺ОСК (Таблица 4), в которых содержание β -катенина может быть кратно увеличено по сравнению с дифференцированными клеткам.

Среди других протестированных препаратов антиглиомный эффект показали ингибитор циклооксигеназы 2 - целекоксиб и антигельминтный препарат - никлозамид. Целекоксиб, в концентрации $48,4 \pm 3,9$ мкмоль/л вызывал гибель 50% клеток глиомы С6 за 24 ч наблюдений, при этом в концентрации $30,1 \pm 2,5$ мкмоль/л и $41,0 \pm 0,7$ мкмоль/л уничтожал половину популяции ОК линии U87MG и T98G за аналогичный период наблюдений. В свою очередь концентрации IC_{50} никлозамида в отношении тестируемых линий были несколько выше целекоксиба и для ОК линии С6 были $53,4 \pm 4,7$ мкмоль/л, для ОК линии U87MG $44,3 \pm 0,7$ мкмоль/л и для линии T98G – $67,0 \pm 3,2$ мкмоль/л. Эталонный препарат группы нестероидных противовоспалительных средств – диклофенак не показал значимого антиглиомного действия, IC_{50} для ОК линии С6 составило $856,7 \pm 64,3$ мкмоль/л.

Наименьшая IC_{50} , среди протестированных лекарственных препаратов была свойственна КФЗ (Рисунок 10). Данный факт представляется особенно важным, если учесть, что антиглиомное действие нестероидных противовоспалительных средств реализуется через – COX-зависимый механизм, а способность КФЗ оказывать противовоспалительное действие [36] позволяет применять этот препарат при лечении лепрозной эритемы. Одновременно, КФЗ вызывает арест клеточного цикла ОК в фазе G2/M, блокирует транскрипционную активность T-клеточного фактора и подавляет биологические эффекты β -катенина в ядре ОСК.

4.3 Обсуждение влияния клофазимина на антиглиомную активность цитостатиков *in vitro*

Имунофенотипические характеристики ОК позволяют в некоторой степени объяснить результат эксперимента по воздействию ТМЗ на ОК (Рисунок 13). ТМЗ, в концентрации 241,2 мкмоль/л, за 24 часа вызывал гибель более половины популяции ОК линии С6, при этом в отношении ОК линии U87MG цитотоксическая активность данного препарата была более высокой и составила $144,4 \pm 13,2$ мкмоль/л, в свою очередь, в отношении клеток линии T98G она была минимальной и составила $735,3 \pm 23,5$ мкмоль/л. Результаты данного этапа эксперимента иллюстрируют значение фактора гетерогенности клеточной популяции в процессе выработки резистентности к ХТ.

Исходя из иерархической модели организации клеточной популяции ГБ [62] допустимо предположить, что под воздействием ТМЗ, в первую очередь погибают дифференцированные клетки, а ОСК сохраняют жизнеспособность и могут пролиферировать путем симметричного деления. Именно в пользу такого сценария свидетельствует отмеченное и выше накопление β -катенина в ОК с индуцированной резистентностью к ТМЗ. Однако важны детали, если исходить из ключевой роли ОСК в формировании резистентности к ТМЗ, то линия T98G – содержащая в составе клеточной популяции довольно большое число ОК иммунофенотипа CD133+, вероятно, является системообразующей, ОК линии С6 и U87MG содержит больше дифференцированных ОК, негативных в отношении

антигена CD133. В этой связи совершенно не удивительно, что цитотоксическая эффективность ТМЗ в отношении этих линий ОК столь сильно различается.

Допустимо предположить, что на данном этапе эксперимента нами смоделирована ситуация химиотерапии впервые выявленной ГБ, которая, как известно, характеризуется высокой гетерогенностью популяции ОК не только в пределах разных биоптатов одной опухоли, но и в пределах ОК, выделенных из одного биоптата. Косвенно в пользу такого утверждения свидетельствуют и литературные данные, описывающие некий разнородностью относительно показателей IC_{50} для клеток глиом. Например, *Chuan He* [101] описаны более низкие показатели IC_{50} для линии С6 – 111,60 мкмоль/л и линии U87MG – 135,75 мкмоль/л. В другом исследовании *Xiao-Jia Huang* [110] описывает IC_{50} ТМЗ для ОК линии С6 равную 560 мкмоль/л, при этом автор указывает на концентрацию 250 мкмоль/л как соответствующую IC_{50} для глиомы линии С6 после 72 часов наблюдений. В еще одном исследовании [114], *Reena Jatyayn* указывает IC_{50} для линии С6 соответствующую 428,2 мкмоль/л, и для U87 – 413,6 мкмоль/л.

Безусловно, подобный разнородностью отчасти объясним разницей в условиях культивирования, содержанием CO_2 , количеством пассажей, а также влиянием экзогенных факторов, используемых для стабилизации генома и т.д. Однако анализируя данные таблицы допустимо предположить, что в значительной мере такая разница может быть объяснена соотношением между различными субтипами ОСК и, возможно, исходным уровнем β -катенина. Однако различия в отклике на ТМЗ далеко не единственная особенность используемой популяции ОК.

Считаем особенно важным подчеркнуть наличие прямой взаимосвязи между ОСК и резистентностью к другим противоопухолевым лекарственным препаратам (Таблица 4, 5). Например, показательно, что IC_{50} для ломустина (CCNU) составляющая $41,5 \pm 5,3$ мкмоль/л и $75,4 \pm 8,5$ мкмоль/л для линий С6 и U87MG – изначально содержащих около 4% CD133+ ОСК возрастает до $92,3 \pm 9,5$ мкмоль/л для линии T98G – которая содержит существенно большее количество этого типа ОК (Таблица 4). Конечно, ломустин – один из самых востребованных в нейроонкологии химиопрепаратов, он является алкилирующим ДНК соединением,

механизм действия которого отчасти сопоставим с ТМЗ, однако подобная зависимость сохраняется и для других цитостатиков.

Так, 5-ФУ – противоопухолевый препарат из группы антиметаболитов угнетает активность фермента тимидилатсинтетазы, что ведет к образованию структурно несовершенной РНК. В нашем эксперименте, тенденция, описанная для ТМЗ и CCNU, СОХРАНЯЕТСЯ и для 5-ФУ: IC_{50} для линий С6 и U87 составляет $7,5 \pm 1,9$ и $9,3 \pm 1,2$ мкмоль/л, при этом для линии Т98G данный показатель возрастает до $15,4 \pm 0,8$ мкмоль/л. Обращает внимание порядковые различия в концентрации ТМЗ и 5-ФУ соответствующие IC_{50} , однако ТМЗ – это пролекарство, которое в организме трансформируется в активный метаболит МТИК, обладающий высокой противоопухолевой активностью. Но фармакокинетические различия с ТМЗ только подтверждают описанную зависимость, справедливую для иринотекана, карбоплатина и паклитаксела (Таблица 5).

КФЗ достоверно усиливает антиглиомное действие ТМЗ в отношении тестируемых ОК. Данный эффект был более выражен в отношении ОК линии С6 (Рисунок 13 А) и Т98G (Рисунок 13 В), при этом был достоверным, но чуть менее выраженным в отношении ОК линии U87MG (Рисунок 13 Б). Результаты эксперимента позволяют утверждать, что цитотоксическое действие связки ТМЗ и КФЗ напрямую зависит от содержания пронеурального CD133⁺ типа ОСК и возрастает с увеличением содержания β-катенина в ОК.

Однако антиглиомное действие ломустина под влиянием КФЗ возрастало (Рисунок 14) в отношении более дифференцированных ОК линии С6 и U87MG (Рисунок 14 А и Б) и практически отсутствовало в отношении ОК линии Т98G. Подобный эффект был характерен для комбинации КФЗ и 5-ФУ (Рисунок 15 А и Б), и был слабо выражен в отношении ОК линии Т98G при комбинации КФЗ и иринотекана (Рисунок 16 В).

Некоторый достоверный антиглиомный эффект в отношении трех используемых линий был отмечен при комбинации КФЗ с карбоплатином (Рисунок 17) – цитостатическим препаратом алкилирующего действия, производным

платины, и паклитакселом (Рисунок 18) – цитостатическим препаратом, относящимся к таксанам.

Результаты данного этапа экспериментов позволяют обоснованно утверждать, что наибольшей цитотоксической эффективностью в отношении клеток ГБ обладают цитостатики алкилирующего действия, причем их антиглиомная эффективность в комбинации КФЗ возрастает по мере увеличения в составе клеточной популяции числа ОСК.

4.4 Обсуждение влияния клофазимина на антиглиомную эффективность цитостатиков на модели глиобластомы с индуцированной резистентностью к темозоломиду

Как уже было сказано выше, в нашем исследовании была разработана экспериментальная модель ГБ резистентной к ТМЗ. Проблема резистентности к цитостатикам является одной из самых острых в онкологии вообще, и в нейроонкологии в частности. Результаты эксперимента позволяют обоснованно утверждать, что наиболее распространенный подход к решению этой проблемы путем банального повышения доз ТМЗ не является рациональным. Резистентность к ТМЗ при лечении глиальных опухолей развивается довольно быстро, причем результаты нашего эксперимента (Таблица 4) напрямую позволяют увязать этот феномен с усилением степени стволовости и экспрессией маркеров ЭМП.

Наиболее значимые различия показателя IC_{50} были характерны для линии T98G составил $972,4 \pm 19,6$ мкмоль/л против $735,3 \pm 23,6$ мкмоль/л в контроле (Рисунок 19В). Выработка резистентности к ТМЗ сопровождалась увеличением IC_{50} для большинства цитостатиков (Таблица 6), протестированных на данной модели. Данный факт никак нельзя игнорировать, поскольку повышение устойчивости ОК к цитостатикам – это всегда результат снижения уровня метилирования генома, который открывает возможность использовать многочисленные механизмы репарации ДНК, как-то эксцизионная, пострепликативная, гомологическая рекомбинация, негомологическое соединение концов и т.д. Исключительно важно, что условием для активации всех этих

механизмов является снижение степени дифференцировки ОК, что и наблюдается в нашем эксперименте (Таблица 4). Как показывают исследования комбинация ломустина или карбоплатина с КФЗ сопровождалась усилением антиглионого действия цитостатиков в отношении ОК с индуцированной резистентностью ТМЗ, что указывает на определенные перспективы такой комбинации у больных рецидивирующей ГБ (Рисунок 20).

4.5 Обсуждение антиглионой активности клофазимина *in vivo*

Имплантация ОК линии С6 приводила к развитию объемных опухолей, сопровождающихся отеком и сдавлением мозговых структур, что наглядно иллюстрирует МРТ-картина объемного процесса (Рисунок 21). Избранная нами тактика лечения полностью соответствовала клиническим рекомендациям Российского общества клинической онкологии и международному протоколу Европейского и Американского обществ медицинской онкологии. Конечно, такой протокол, в первую очередь, предполагает радикальную операцию, в ходе которой большая часть опухолевой массы удаляется. Однако реальность вносит свои коррективы. Во-первых, оперируется далеко не каждый больной, во-вторых, даже потенциальные возможности ХЛТ ограничены состоянием пациента. Однако описанные сложности только добавляют ценности нашим результатам.

В нашем эксперименте мы ставили цель воспроизвести стандартный протокол лучевой терапии в 60 Гр, используя современную γ -терапевтическую установку, однако тяжесть состояния экспериментальных крыс и возможность его еще большего ухудшения, вызванная многократным введением животных в медикаментозный сон на период облучения не позволила нам реализовать все требования протокола, что само по себе достаточно символично и соответствует клинической реальности.

В клинической практике ХЛТ – это всегда шаг в неизвестность. Лучевая терапия повреждает и убивает ОК, в этой связи несколько не удивительно, что облучение в суммарной дозе 24 Гр (Рисунок 22) в сочетании с химиотерапией ТМЗ способствовала почти двукратному уменьшению объема опухоли в мозге крыс группы ХЛТ до $114,65 \pm 9,8$ мм³ по сравнению с $226,13 \pm 19,11$ мм³ в интактном

контроле. В контексте результатов предшествующего эксперимента *in vitro* совершенно ожидаемыми являются результаты, полученные в третьей группе животных, где совместное применение ХЛТ с КФЗ сопровождалось более значимым снижением объема опухоли до $98,23 \pm 10,7$ мм³. Одновременно у животных групп ОКВ+КФЗ и ДКВ+КФЗ отмечались более существенные, достоверно значимые изменения объема опухоли в мозге крыс по сравнению с группой ХЛТ, средние размеры опухолевого узла составили $48,57 \pm 5,9$ и $23,19 \pm 8,6$ мм³, соответственно.

На результатах применения ИТ следует остановиться особенно. В нашем эксперименте использована ДКВ, полученная на основе клеток костного мозга здорового сиблинга. Как следует из результатов эксперимента комбинация ДКВ и КФЗ сопровождается развитием аддитивного антиглиомазного эффекта. Допустимо предположить, что такой подход будет более эффективным, чем вакцины, полученные из аутологических CD45⁺ мононуклеарных клеток «истощенного» фенотипа, рекрутируемых из крови больного. Такой подход имеет будущее, поскольку активное развитие технологий биокапитализации и биострахования уже позволяет больным воспользоваться собственными, заранее законсервированными клетками и тканями.

4.6 Обсуждение функционального статуса экспериментальных животных

Масса тела является одним из самых важных интегративных параметров в онкологии (Рисунок 23). Как следует из эксперимента развитие опухоли в мозге контрольных животных сопровождалось снижением массы тела, что связано с интоксикацией продуктами метаболизма опухоли (черная линия, Рисунок 23). Начало ХЛТ сопровождалось более выраженной потерей массы тела, однако на завершающих этапах лечения данный параметр довольно значимо (синяя линия, Рисунок 23) корректировался. Примечательно, что в группе ХЛТ+КФЗ этот параметр корректировался более существенно (коричневая линия, Рисунок 23), что может быть связано как с усилением противоопухолевого эффекта ХЛТ, так и собственными фармакологическими эффектами КФЗ. Применение ИТ вело к значимому увеличению массы тела (зеленая и красная линии, Рисунок 23), что

сопровождалось другими объективными данными, свидетельствующими об улучшении функционального статуса животных.

Результаты нейробиологического тестирования экспериментальных животных свидетельствуют об улучшении функционального состояния крыс с глиомой С6 под влиянием терапии. Общеизвестно, что циторедукционное действие облучение и химиотерапии сопровождается уменьшением объема опухоли, что ведет к снижению внутричерепного давления, некоторому смягчению и регрессу неврологической симптоматики и проявляется улучшением ряда неврологических показателей. Животные группы ХЛТ+КФЗ не обнаруживали значимых негативных различий с группой крыс получивших только ХЛТ, что указывает на отсутствие дополнительных токсических влияний КФЗ.

Важно, что добавление ИТ в схему лечения не сопровождалось развитием нежелательных неврологических симптомов, что могло бы быть вызвано усилением отека мозга. Между тем, усиление горизонтальной и вертикальной активности у животных группы КФЗ+ОКВ и КФЗ+ДКВ указывает на общее улучшение состояния экспериментальных животных, что сопровождается уменьшением тревожности и усилением исследовательской активности. Безусловно, каскада использованных тестов недостаточно для проведения более масштабной и объективной оценки потенциальных нейробиологических последствий применения КФЗ и ИТ в комплексном лечении ГБ, однако данный эксперимент свидетельствует о потенциальной возможности такого лечения без причинения неприемлемого ущерба для больного.

4.7 Обсуждение данных гематологического и цитокинового статуса крыс различных групп

Как известно, в большинстве случаев ХЛТ сопровождается выраженным снижением содержания CD45 иммунцитов, что и было показано в нашем эксперименте (Рисунок 26 А). Важно, что такое состояние только подтверждает невозможность использования аутологического материала для создания ДКВ. Миелосупрессия сопровождается снижением содержания CD68⁺ макрофагов – M1

фенотипа (Рисунок 26 Б), обладающих высокой фагоцитарной активностью, вовлеченных в процессы взаимодействия с ОК и способных заякориваться в определенном участке опухолевой ткани. Одновременно, у животных группы ХЛТ и ХЛТ+КФЗ наблюдается снижение содержания CD206 макрофагов в М2-фенотипа в сыворотке крови (Рисунок 26 В) и снижением содержания С - реактивного белка (Рисунок 26 Г).

Применение ОКВ и ДКВ в комбинации с КФЗ у животных после ХЛТ сопровождается коррекцией миелосупрессии, увеличением содержания CD68⁺ и снижением CD206⁺ макрофагов, ростом концентрации С-реактивного белка – это гликопротеина, вырабатываемого печенью под действием провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1, фактора некроза опухолей – альфа и в особенности интерлейкина-6). В естественных условиях синтез С-реактивный белок увеличивается уже через 6 часов после развития воспалительного процесса, а его концентрация в крови возрастает в 10-100 раз в течение 24-48 часов после начала воспаления. Допустимо предположить, что более высокое содержание С-реактивного белка в группе ДКВ+КФЗ связано с использованием клеток костного мозга здорового сиблинга, не истощенного воздействием опухоли и ХЛТ.

Экстраполяция данных нашего эксперимента на результаты повседневной клинической практики позволяют выявить важную деталь: снижение степени дифференцировки ОК, обусловленное процессами ЭМП, вызванными воздействием химиотерапии, сопровождается резким снижением числа лейкоцитов, данный феномен имеет прямую взаимосвязь и фактически предопределяет прогноз (Рисунок 40).

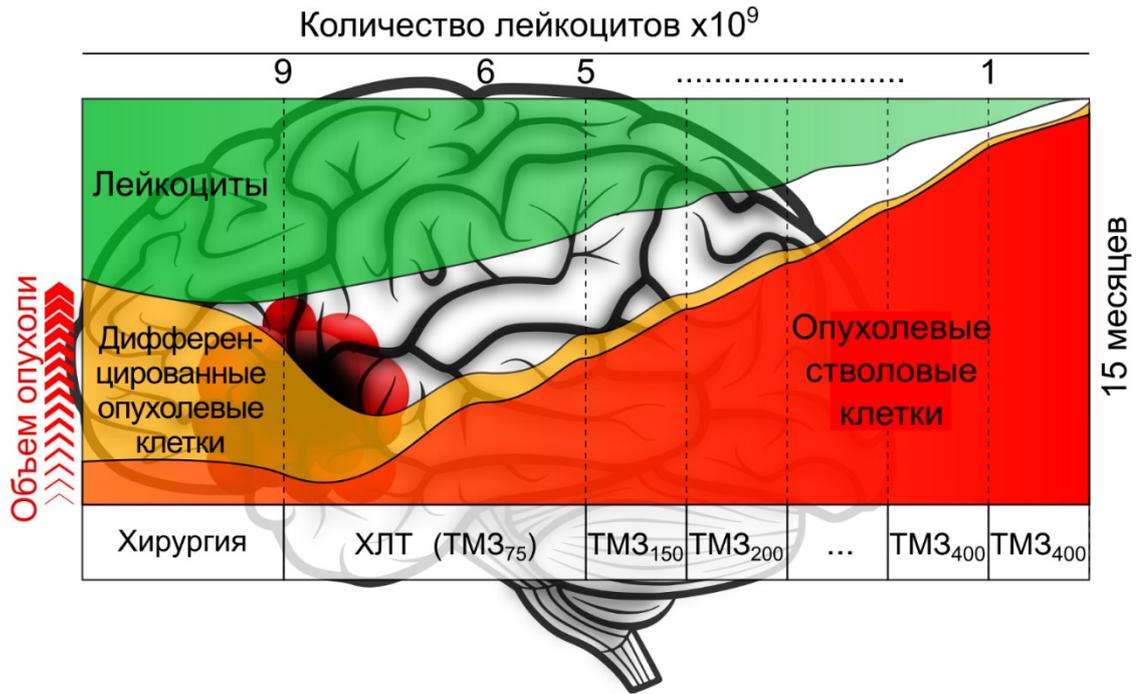


Рисунок 40 – Взаимоотношение между иммунными клетками и опухолевыми стволовыми клетками глиобластомы: зеленый – CD45+иммуноциты в крови больного. Желтый – дифференцированные ОК, красный: опухолевые CD44+ стволовые клетки мезенхимального (β -катенин \uparrow , N-кадгерин \uparrow , E – кадгерин \downarrow) и уровень TGF β микроокружением опухоли

В пользу этого утверждения свидетельствует анализ цитокинового статуса экспериментальных животных (Рисунок 27). В крови животных группы ХЛТ и ХЛТ+КФЗ содержание провоспалительных цитокинов было существенно ниже, чем в контроле, где их концентрация IL1 β , IL 6 и 18 было тоже не велика. Стимуляция ОКВ сопровождалось значительным увеличением содержания IL1 β и IL18, при этом наибольшее усиление содержания провоспалительных цитокинов было отмечено у животных получавших ДКВ+КФЗ.

4.8 Обсуждение результатов морфохимического анализа опухолевых узлов в мозге крыс

Опухоль, сформированная в головном мозге крыс, характеризовалась сосредоточением полиморфных пролиферирующих клеток с различным количеством ядер вокруг питающих кровеносных сосудов, интенсивным

формированием неопластического русла, быстрым развитием некрозов. Данная модель используется в нашей лаборатории с 2013 г. и довольно хорошо изучена (Рисунок 29, 30). Однако введение ОКВ в лапку животного с глиомой С6 после курса ХЛТ сопровождалось выраженной воспалительной реакцией в зоне введения иммунологического адьюванта (Рисунок 28). Выраженность и острота воспалительной реакции у крыс данной группы и обогащение спектра воспалительных цитокинов в сыворотке крови (Рисунок 27, 28) свидетельствует о важности такой стимуляции.

Однако введение ДКВ сопровождалось куда более существенным усилением продукции цитокинов воспалительного спектра в организме экспериментальных животных. При этом важно, что в первую очередь происходило усиление синтеза ИЛ 1 β и ИЛ 18, в то время как ИЛ 6 не обнаруживал динамически значимых изменений (Рисунок 27). С одной стороны, данный факт указывает, что изменение профиля экспрессии цитокинов связано именно с экспериментальными манипуляциями, однако при этом нельзя исключить некоторые существенные особенности.

ИЛ 1 β – классический провоспалительный цитокин, синтезируемый главным образом макрофагами и частично активированными В-клетками. Как правило его продукция свидетельствует об активности процессов презентации антигена и выходе иммунцитов из состояния анергии. Интерлейкин 6 является одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления, он стимулирует мобилизацию энергии, которая приводит к повышению температуры тела, а также является главным стимулятором синтеза печенью белков острой фазы. Сопоставляя уровень ИЛ6 с данными рисунка 27Г крайне сложно избавиться от мысли, что он является некоторым критерием анергии, характеризующим состояние процессов иммунной защиты в организме крысы с глиальной опухолью.

Как следует из эксперимента применение КФЗ несколько снижает остроту иммунной реакции, что вполне допустимо рассматривать как охранительный фактор, поскольку усиление воспаления практически всегда ведет к усилению отека и отягощению неврологической симптоматики.

Довольно ожидаемым является факт обогащений опухолевой ткани в головном мозге животных группы ОКВ и ДКВ маркерами IBA1-белка микроглии\макрофагов. Как следует из данных морфологического анализа IBA1⁺ клетки в неопластической ткани, выделенной из мозга крыс данных групп, были звездчатой формы с многочисленными сильно ветвящимися отростками, что свидетельствует об их высокой функциональной активности, в противовес округлым клеткам с крупным телом и короткими отростками у крыс группы ХЛТ (Рисунок 31).

Примечательно, что применение ОКВ и ДКВ обогащает опухолевую ткань и перитуморальную зону маркерами воспалительного типа макрофагов иммунореактивных в отношении антигена CD68 (Рисунок 32), формирующие кляксообразные скопления на границе между опухолью и тканью мозга. Одновременно, в переопуховом пространстве уменьшается снижение CD206⁺ иммунореактивных M2-микроглиоцитов. (Рисунок 33, 34). Указанные обстоятельства позволяют предположить, что таким образом достигается модификация микроокружения ОСК, что нарушает продукцию wnt-лигандов и других профакторов активации внутриклеточного β -катенина.

Как следует из результатов иммуногистохимического анализа группе интактного контроля (Рисунок 36 А и Б) антителами против β -катенина к 14 дню наблюдений преимущественно окрашивалась цитоплазма ОК, однако к 21 дню его количество существенно увеличивалось. При этом в группе ХЛТ (Рисунок 36 В и Г) антителами к этому белку окрашивалась как цитоплазма, так и ядра ОК, что может быть связано с его накоплением в следствии адаптационных процессов в неопластической ткани, запущенными ХЛТ. В этой связи особенно примечательно, что к 21 дню в группе ХЛТ отмечались отдельные, кластерные скопления ОК иммунореактивных в отношении β -катенина, при этом маркер был локализован как в ядрах, так и в цитоплазме.

Еще более наглядны результаты иммуногистохимического анализа у животных третьей группы, где к 14 дню наблюдений (Рисунок 36 Д и Е) β -катенин имел преимущественно цитоплазматическую локализацию и был довольно

неравномерно распределен в опухоли. К 21 дню наблюдений количество ОК иммунореактивного в отношении данного маркера критически уменьшалось, причем скопления β -катенин⁺ элементов выявлялись в виде каймы на границе между опухолью и перитуморальной пространством.

Применение комбинации КФЗ и ИТ сопровождалось значимым (Рисунок 37, 38) снижением содержания β -катенина в неопластической ткани у крыс групп ХЛТ+КФЗ+ОКВ и ХЛТ+КФЗ+ОКВ, что является важнейшим аргументом в пользу данной стратегии.

4.9 Обсуждение выживаемости экспериментальных животных

Выживаемость – интегративный показатель итоговой эффективности всех терапевтических усилий в онкологии и самый объективный критерий успеха. Достижение медианы выживаемости в 12 месяцев при использовании ТМЗ [199] и 15 месяцев при использовании ТМЗ и бевацизумаба стало прорывом в нейроонкологии, однако совершенно недопустима идеологизация или гиперболизация показателей выживаемости.

Клиническая реальность такова, что использование хирургического метода в ряде случаев позволяет решить не только задачи первичной редукции опухолевой массы, но и впоследствии решать паллиативные задачи, например, выполнить шунтирующие операции, снижающие внутричерепное давление и устраняющие другие жизнеугрожающие симптомы, что может продлить жизнь пациента. Однако качество жизни и степень зависимости таких больных от аппаратного обеспечения и от окружающих в ряде случаев не совместимо с самим понятием жизнь. В свете сказанного, оценка выживаемости животных в нашем эксперименте в обязательном порядке дополнялась вышеописанными нейробиологическими тестами, позволяющими объективно судить о состоянии задействованных в эксперименте животных [21].

Медиана выживаемости экспериментальных животных контрольной группы составила $24,5 \pm 2,5$ дня, группы ХЛТ – 45 ± 5 дня (Рисунок 39), а группы ХЛТ+КФЗ – 60 ± 12 дней, что само по себе весьма показательно. Применение КФЗ

способствует увеличению эффекта от химиолучевой терапии, при этом использование иммунотерапии способствует воспалительной модификации микроокружения ОСК, что сопровождается резким содержанием β -катенина в опухолевой ткани. В этой связи медиана выживаемости крыс, получивших ОКВ совместно с клофазимином, была достоверно больше и составила $76,5 \pm 6,5$ дня, а животных группы ДКВ+КФЗ медиана выживаемости была максимальной и составила 90 ± 7 дней, что позволяет напрямую утверждать, что КФЗ повышает эффективность цитостатической химиотерапии, а иммунотерапия повышает антиглиомный потенциал КФЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение населения объявлено одним из больших вызовов для научно – технологического развития нашей страны. В этой связи особую важность приобретает проблема эффективного лечения онкологических заболеваний, для которых возраст является ключевым фактором риска. Работа выполнена в соответствии с приоритетами развития медицинской науки в нашей стране и ориентирована на создание способов персонализированного использования лекарственных препаратов в комплексном лечении ГБ. При планировании настоящей работы мы исходили из того факта, что ХТ является едва ли не единственным методом продления жизни больного ГБ, при этом главным ограничением на пути реализации всех антиглиомных возможностей химиотерапии является развитие резистентности к цитостатикам.

Результаты настоящего исследования позволяют внести определенный вклад в дискуссию о молекулярных и клеточных механизмах резистентности инвазивных злокачественных глиом к химиопрепаратам. Совершенно очевидно, что эскалация доз цитостатиков, традиционно используемая в онкологической практике, не является эффективным методом борьбы за жизнь больного. Результаты проведенных нами экспериментов свидетельствуют, что систематическое воздействие ТМЗ на клетки ГБ сопровождается селекцией особого «мезенхимального» CD44⁺ фенотипа ОК, который характеризуется усилением синтеза миграционного N-кадгерина, при одновременном снижении содержания адгезионного E-кадгерина. Подобное кадгериновое переключение указывает на возросшую инвазивную активность ОК и является ведущим признаком ЭМП, перманентно генерирующего все новые и новые популяции ОСК. Важнейшим признаком фармакорезистентных ОК является увеличение содержания β-катенина, уровень которого может являться одним из факторов прогноза эффективности ХТ у больных ГБ, кроме того, этот белок может быть потенциально важным маркером ОСК.

Следуя заявленным приоритетам рационального использования лекарственных средств, в фокусе нашего внимания антибактериальный перепрофилируемый препарат клофазимин, который на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* показал цитостатическую (антиметастатическую)

активность, в концентрации 37,6 мкмоль/л вызывал гибель половины популяции ОК глиомы линии С6 и демонстрировал приемлимые IC_{50} для клеток ГБ линии U87MG и T98G – 29,0 и 38,3 мкмоль/л. В диапазоне полуингибирующих концентраций клофазимин усиливал цитотоксическую активность ТМЗ, оказывал более выраженное цитостатическое действие на ОК с индуцированной резистентностью к ТМЗ, оказывал цитотоксическое воздействие на ОК, эффективность которого усиливалась в комбинации с другими цитостатиками.

О большом антиглиомном потенциале клофазимина свидетельствуют результаты эксперимента *in vivo*, где этот препарат усиливает антиглиомное действие ХЛТ. Однако недостатки ХЛТ – прямое следствие ее несомненных достоинств. Лейкопения и агранулоцитоз неизбежно сопровождают любую, даже самую эффективную схему лечения цитостатиками. В нашем эксперименте ХЛТ уменьшала объем опухоли в мозге экспериментальных животных, что сопровождалось значительным снижением числа элементов числа CD 45⁺ иммунцитов в кровеносном русле. Подобная ситуация является одним из ключевых критериев клинической релевантности проведенного эксперимента. Неразрывная связь положительного клинического эффекта от химиотерапии и необходимости его удержать путем коррекции лейкопении послужили основанием для утверждения о наступлении эры иммунотерапии в нейроонкологии.

Однако химиотерапия и иммунотерапия – это две стороны одной медали. Как показывают наши исследования на 7 сутки культивирования клеток костного мозга крысы в присутствии лизатов ОК, в среде, содержащей ИЛ4 и ГМ-КСФ – 82,3±4,2% клеточных элементов окрашиваются антителами против общелейкоцитарного антигена CD45, 65,4±3,2% против антигена CD68-маркера воспалительного типа макрофагов и 75,5±5,3% против антигена CD80-маркера дендритных клеток. Подобная картина далеко не всегда наблюдается в практической медицине, поскольку аутологический материал больного является истощенным, однако предложенный нами подход расширяет спектр возможностей для эксперимента и позволяет более объективно судить о возможностях комбинации иммунотерапии и химиотерапии.

Показательно, что введение опухолево-клеточной (ОКВ) и дендритно-клеточной вакцины (ДКВ) в организм животных с глиомой С6 после

экспериментальной ХЛТ сопровождается усилением противоопухолевого иммунного ответа, в виде развития локальной воспалительной реакций, увеличения содержания интерлейкинов 1β и 18 в сыворотке крови, увеличением содержания $M1$ макрофагов в крови и $IBA1^+$, $CD68^+$ провоспалительно активированной микроглии в опухолевой ткани. Комбинированное использование ДКВ и клофазимина сопровождается развитием аддитивного антиглиомного эффекта, ведет к модификации микроокружения опухоли и значительному уменьшению содержания β -катенина в веществе мозга и сопровождается максимальной выживаемостью экспериментальных животных (Рисунок 41).

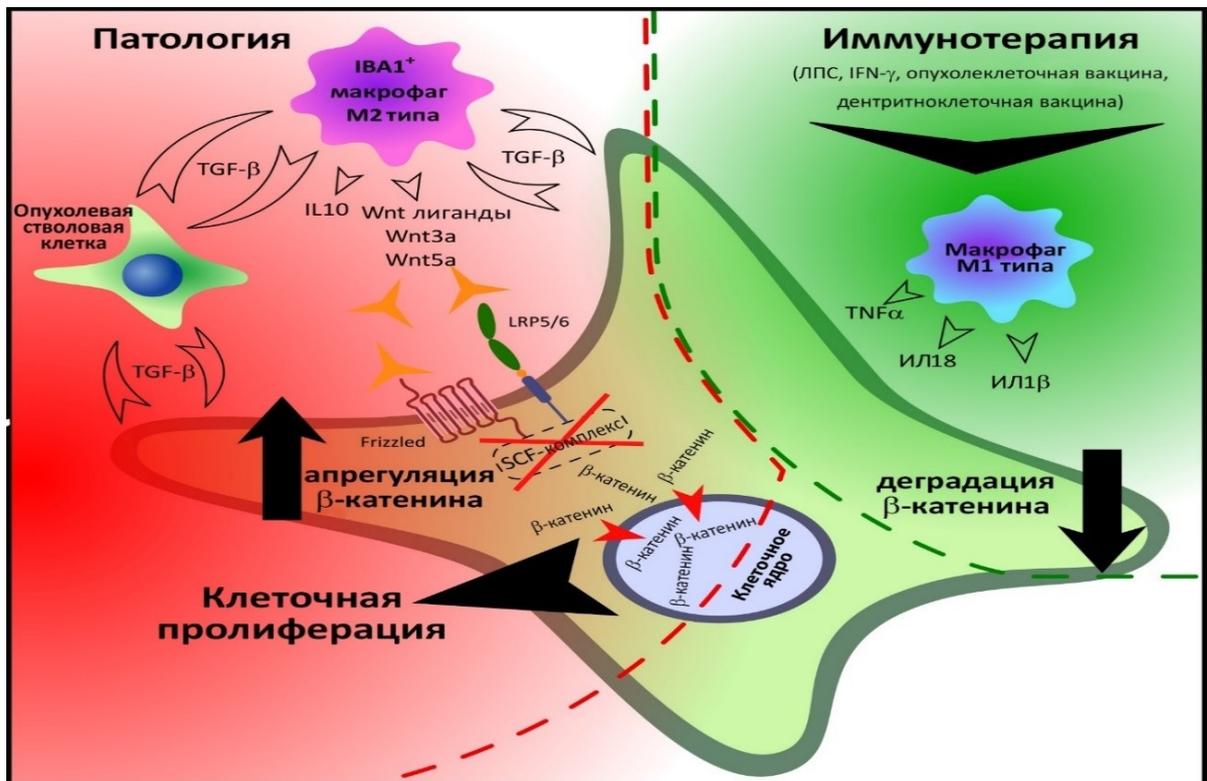


Рисунок 41 – Итоговая схема коррекции внутренних и внешних механизмов пластичности стволовых клеток глиобластомы

Результаты проведенных экспериментов свидетельствует в пользу того, что ИТ усиливает антиглиомный потенциал клофазимина и подобная комбинация может быть использована не только для коррекции внутренних молекулярных механизмов пластичности ОСК, но и комплексной регуляции микроокружения этого типа клеток, что формирует качественно новый подход к лечению ГБ.

ВЫВОДЫ

1. Клофазимин оказывает дозозависимое цитостатическое и цитотоксическое действие на опухолевые клетки линий U87MG и T98G глиобластомы человека, а также C6 глиомы крысы. Антиглиомная эффективность клофазимицина возрастает с увеличением содержания β -катенина в ОК.

2. Клофазимин ($p < 0,05$) усиливает цитотоксическое действие темозоломида, ломустина и 5-фторурацила в отношении клеток глиальных опухолей линий C6 и U87MG, а также цитотоксическое действие карбоплатина и паклитаксела в отношении ОК глиобластомы человека линии T98G. Цитотоксическое действие ломустина и карбоплатина в отношении опухолевых клеток линии T98G глиобластомы с индуцированной резистентностью к темозоломиду в комбинации с клофазимином достоверно ($p < 0,05$) возрастает.

3. Клофазимин усиливает антиглиомное действие химиолучевой терапии, что сопровождается уменьшением объема опухоли в мозге, увеличением массы тела и улучшением функционального статуса экспериментальных животных.

4. Комбинация клофазимицина с опухолевыхклеточной или дендритно-клеточной вакцинами сопровождается увеличением числа $CD45^+$ $CD68^+$ иммунцитов и интерлейкинов 1β и 18 в крови крыс с глиомой C6, усилением воспалительной реакции, и увеличением числа $IBA1^+$ $CD68^+$ клеток микроглии в опухолевом очаге, снижению содержания β -катенина в веществе мозга и максимальной выживаемостью экспериментальных животных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется использовать разработанную модель химиорезистентной линии глиобластомы человека для тестирования новых лекарственных препаратов и их комбинаций.
2. Рекомендуется провести доклинические исследования с целью подтверждения практического значения антиглиомадного действия клофазимина в комбинации с иммунотерапией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаев, О.А. Начальные результаты лечения рецидивных глиобластом головного мозга с применением резекции в сочетании с интраоперационной баллонной электронной брахитерапией / О.А. Абдуллаев, А.С. Гайтан, Н. Салим [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – № 4. – С. 99–109.
2. Абрашова, Т.В. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Т.В. Абрашова, Я.А. Гушин, М.А. Ковалева // СПб: Изд-во «ЛЕМА», 2013. – 116 с.
3. Анашкина, М.В. Влияние объема хирургического вмешательства на результаты комплексного лечения анапластических астроцитом (grade III) головного мозга / М.В. Анашкина, Г.А. Пеньшин, С.М. Милюков, Т.Р. Измайлов // Вестник "Российского научного центра рентгенорадиологии". – 2014. – Т. 1, № 14. – 15 с.
4. Балдуева, И.А. Дендритноклеточные вакцины в иммунотерапии больных солидными опухолями: учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – СПб. НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. – 2020. – 128 с
5. Бобков, М.С. Комплексная терапия глиальной опухоли высокой степени злокачественности (клинический случай) // Вестник новых медицинских технологий. – 2023. – № 3. – С. 68–71.
6. Брюховецкий, А.С. Клеточные технологии в нейроонкологии: циторегуляторная терапия глиальных опухолей головного мозга. – М.: Издательская группа РОНЦ, 2011. – 736 с.
7. Василец, Ю.Д. Wnt-сигнальный каскад в патогенезе мультиформной глиобластомы / Д.Ю. Василец, Н.Е. Арноцкая, И.А. Кудрявцев [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – № 5. – С. 94–103.
8. Гуляев, Д.А. Влияние радикальности удаления глиобластомы на длительность безрецидивного периода / Д.А. Гуляев, П.В. Красношлык,

- Ю.С. Лахина, [и др.] // Российский биомедицинский журнал. – 2018. – Т. 19. – С. 1254–1264.
9. Генс, Г.П. Глиобластома: Молекулярно-генетический портрет и современные терапевтические стратегии лекарственного лечения / Г.П. Генс, В.Д. Санникович, В.А. Милейко, [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – № 3. – С. 60–76.
 10. Грачев, Ю.Н. Основные подходы к лечению рецидивной глиобластомы / Ю.Н. Грачев, Д.А. Церковский, Е.А. Маслаков, [и др.] // Онкологический журнал. – 2019. – Т. 13, № 1. – С. 117–135.
 11. Данилов, Р.К. Руководство по гистологии 2т. СПб, 2011. – 830 с.
 12. Дьяченко, А.А. Эпидемиология первичных опухолей головного мозга / А.А. Дьяченко, А.В. Субботина, Т.Р. Измайлов, [и др.] // Вестник "Российского научного центра рентгенорадиологии". – 2013. – Т. 1, № 13. – 11 с.
 13. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Мин.здрава России. – 2019. – 250 с.
 14. Кит, О.И. Мультиформная глиобластома: патогенез и молекулярные маркеры / О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Э. Е. Расторгуев, [и др.] // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63, № 5. – С. 695–702.
 15. Коновалов, А.Н. Стандарты, опции и рекомендации в лечении опухолей ЦНС / А.Н. Коновалов, А.А. Потапов, В.А. Лошаков, [и др.] // Ассоциация нейрохирургов России. – 2009. – 35 с.
 16. Кузнецова, Н.С. Современные подходы к терапии глиобластомы / Н.С. Кузнецова, С.В. Гурова, А.С. Гончарова, [и др.] // Южно-российский онкологический журнал. – 2023. – № 4. – С. 52–64.
 17. Кулева, С.А. Иммунология и перспективы иммунотерапии злокачественных глиом: использование факторов гуморального

- иммунитета / С.А. Кулева, К.М. Борокшинова, А.Е. Друй // Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – № 4. – С. 21–28.
18. Маркер стволовых клеток в глиобластоме человека: локализация опухоли и прогноз заболевания / Д.А. Гуляев, П.В. Красношлык, Ю.С. Лахина [и др.] // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. – 2019. – № 9. – С. 70–79.
19. Мацко, М.В. Влияние клинических характеристик и объема циторедукции у больных с первичной глиобластомой на общую выживаемость / М.В. Мацко Д.Е. Мацко, Н.М. Волков, [и др.] // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63, № 6. – С. 907–914.
20. Мацко, М.В. Изменение уровня экспрессии гена MGMT у пациентов с первичной глиобластомой после рецидива. Влияние клинических характеристик и экспрессии гена MGMT на продолжительность жизни больных / М.В. Мацко, С.С. Скляр, Е.А. Улитин, [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2021. – № 3. – С. 5–17.
21. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – Москва. – 2012. – 944 с.
22. Митрофанов, А.А. Причины лекарственной устойчивости и рецидивов глиобластом / А.А. Митрофанов, Д.Р. Насхлеташвили, В.А. Алешин, [и др.] // Опухоли головы и шеи. – 2021. – № 1. – С. 101–108.
23. Морковин, Е. Оценка психоневрологического дефицита у грызунов: основные методы / Е. Морковин, Д. Куркин, И. Тюренков, [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности. – 2018. – Т. 68, № 1. – С. 3–15.
24. Никифорова, З.Н. Опухолевые стволовые клетки мультиформной глиобластомы / З.Н. Никифорова, И.А. Кудрявцев, Н.Е. Арноцкая, [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т. 3, № 2. – С. 26–33.
25. Самородова, И.А. Эффективность высокодозной консолидации и аутологичной трансплантации костного мозга в первой ремиссии острого миелоидного лейкоза / И.А. Самородова, С.Н. Бондаренко, В.Н. Овечкина, [и др.] // Онкогематология. – 2018. – № 1. – С. 8–20.

26. Сулин, К.А. Иммуногистохимическое выявление маркеров стволовых клеток, факторов транскрипции и PD- L1 в злокачественных глиомах взрослых пациентов / К.А. Сулин, Б.Э. Гальковский, А.А. Петров, [и др.] // Гены и клетки. – 2021. – Т. 16, № 4. – С. 29–37.
27. Тимофеева, С.В. Современные достижения САТ-Т иммунотерапии для лечения глиобластомы / С.В. Тимофеева, А.О. Ситковская, И.А. Новикова, [и др.] // Медицинская иммунология. – 2021. – № 3. – С.483–496.
28. Тягунова, Е.Е. Особенности химио- и радиотерапии пациентов с глиобластомой / Е.Е. Тягунова, А.С. Захаров, Р.К. Костин, [и др.] // Медицинский альманах. – 2022. – Т. 1, № 70. – С. 49–56.
29. Чернов, А.Н. Молекулярные механизмы множественной лекарственной устойчивости глиобластомы человека / А.Н. Чернов, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, [и др.] // Вопросы онкологии. – 2021. – Т. 67, № 1. – С. 20–28.
30. Чубукина, Ж.В. Динамика показателей клеточного иммунитета в процессе аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с множественной миеломой / Ж.В. Чубукина, Т.В. Глазанова, И.И. Кострома, [и др.] // Вестник гематологии. – 2020. – № 1. – С. 22–27.
31. Яковленко, Ю.Г. Глиобластомы: современное состояние проблемы / Ю.Г. Яковленко // Медицинский вестник Юга России. – 2019. – Т. 10, № 4. – С. 28–35.
32. Ярыгин, К.Н. Регенеративная биология и медицина. Книга II. / К.Н. Ярыгин, В.В. Семченко, С.И. Ерениев [и др.] // Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы. – Екатеринбург: Омская обл.типография. – 2015. – 316 с.
33. Яшин, К.С. Персонафицированное лечение глиом головного мозга: таргетная терапия, пациент-специфические опухолевые модели. ОБЗОР/ К.С. Яшин, Д.В. Южакова, Д.А. Сачкова, [и др.] // Современ. технол. мед. – 2023. – № 3. – С. 61–73.
34. 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.

35. Agliardi, G. Intratumoral IL-12 delivery empowers CAR-T cell immunotherapy in a pre-clinical model of glioblastoma / G. Agliardi, A.R. Liuzzi, A. Hotblack, [et al.] // *Nat Commun.* – 2021. – Vol. 12, № 1. – 11 p.
36. Ahmed, K. Towards the first targeted therapy for triple-negative breast cancer: Repositioning of clofazimine as a chemotherapy-compatible selective Wnt pathway inhibitor / K. Ahmed, A. Koval, Jn. Xu, [et al.] // *Cancer Lett.* – 2019. – Vol. 449. – P. 45–55.
37. Alamón, C. Sunitinib-Containing Carborane Pharmacophore with the Ability to Inhibit Tyrosine Kinases Receptors FLT3, KIT and PDGFR- β , Exhibits Powerful In Vivo Anti-Glioblastoma Activity / C. Alamón, B. Dávila, M.F. García, [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12, №11. – 21 p.
38. Alghamri, M.S. Systemic Delivery of an Adjuvant CXCR4-CXCL12 Signaling Inhibitor Encapsulated in Synthetic Protein Nanoparticles for Glioma Immunotherapy / M.S. Alghamri, K. Banerjee K, A.A. Mujeeb, [et al.] // *ACS Nano*. – 2022. – Vol. 16, № 6. – P. 8729–8750.
39. Alkailani, M.I. WNT signaling at the intersection between neurogenesis and brain tumorigenesis / M.I. Alkailani, M. Aittaleb, F. Tissir // *Front Mol Neurosci*. – 2022. – Vol. 15. – P. 1017568.
40. Allani, S.K. Sulindac induces differentiation of glioblastoma stem cells making them more sensitive to oxidative stress / S.K. Allani, H. Weissbach, M.A. Lopez Toledano // *Neoplasma*. – 2018. – Vol. 65, № 3. – P. 376–388.
41. Allen, M. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news / M. Allen, M. Bjerke, H. Edlund, [et al.] // *Sci Transl Med*. – 2016. – Vol. 8, № 354. – 8 p.
42. Araujo Moura, A.W. Nivolumab for newly and recurrent glioblastoma multiforme treatment: A systematic review and meta-analysis / A.W. Araujo Moura, S. da Silva Rodrigues, T.F. de Oliveira, [et al.] // *J Oncol Pharm Pract*. – 2023. – Vol. 29, № 7. – P. 1736–1747.
43. Aravantinou-Fatorou, A. Comparison of the outcomes following bevacizumab and/or temozolamide/radiosurgery treatment in patients with glioblastoma / A.

- Aravantinou-Fatorou, V.E. Georgakopoulou, N. Mathioudakis, [et al.] // *Mol Clin Oncol.* – 2023. Vol. 19, № 3. – P.7-3.
44. Arrieta, V.A. Immune checkpoint blockade in glioblastoma: from tumor heterogeneity to personalized treatment / V.A. Arrieta, C. Dmello, D.J. McGrail, [et al.] // *J Clin Invest.* – 2023. – Vol. 133, № 2.
45. Baharom, F. Systemic vaccination induces CD8⁺ T cells and remodels the tumor microenvironment / F. Baharom, R.A. Ramirez-Valdez, A. Khalilnezhad [et al.] // *Cell.* – 2022. – Vol. 185, № 23. –P.4317-4332.
46. Barbarite, E. The role of brachytherapy in the treatment of glioblastoma multiforme / E. Barbarite, J.T. Sick, E. Berchmans, [et al.] // *Neurosurg Rev.* – 2017. – Vol. 40, № 2. –P.195–211.
47. Bayik, D. Cancer stem cell-immune cell crosstalk in tumour progression / D. Bayik, J.D. Lathia // *Nat Rev Cancer.* – 2021. – Vol. 21, № 8. – P.526–536.
48. Behrooz, A. Wnt and PI3K/Akt/mTOR Survival Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma / A. Behrooz, Z. Talaie, F. Jusheghani, [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 25, № 3. – P. 13-53.
49. Behrooz, A.B. Could We Address the Interplay Between CD133, Wnt/ β -Catenin, and TERT Signaling Pathways as a Potential Target for Glioblastoma Therapy? / A.B Behrooz, A. Syahir // *Front Oncol.* – 2021. – 9 p.
50. Beier, CP, Beier D. CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma/ C.P. Beier, D. Beier // *Front Biosci (Elite Ed).* – 2011. – Vol. 3, № 2. – P. 701–710.
51. Belk, J.A. Epigenetic regulation of T cell exhaustion/ J.A. Belk, B. Daniel, A.T. Satpathy // *Nat Immunol.* – 2022. – Vol. 23, № 6. – P. 848–860.
52. Berthois, Y. Differential expression of miR200a-3p and miR21 in grade II-III and grade IV gliomas: evidence that miR200a-3p is regulated by O⁶ -methylguanine methyltransferase and promotes temozolomide responsiveness / Y. Berthois, C. Delfino, P. Metellus, [et al.] // *Cancer Biol Ther.* – 2014. – Vol. 15, №7. – P. 938–950.

53. Bikfalvi, A. Challenges in glioblastoma research: focus on the tumor microenvironment / A. Bikfalvi, C.A. da Costa, T. Avril, [et al.] // Trends Cancer. – 2023. – Vol. 9, № 1. – P. 9–27.
54. Bindra, R.S. Penetrating the brain tumor space with DNA damage response inhibitors / R.S. Bindra // Neuro Oncol. – 2020. – Vol. 22, № 12. – P. 1718–1720.
55. Bogdahn, U. Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF- β 2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study / U. Bogdahn, P. Hau, G. Stockhammer, [et al.] // Neuro Oncol. – 2011. – Vol. 13, № 1. – P. 132–142.
56. Bonnet, D. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell / D. Bonnet, J.E. Dick // Nat Med. – 1997. – Vol. 3, № 7. – P. 730–737.
57. Brennan, C.W. The somatic genomic landscape of glioblastoma / C.W. Brennan, R.G. Verhaak, A. McKenna, [et al.] // Cell. – 2013. – Vol. 155, № 2. – P. 462–477.
58. Brown, C.E. Off-the-shelf, steroid-resistant, IL13R α 2-specific CAR T cells for treatment of glioblastoma / C.E. Brown, A. Rodriguez, J. Palmer, [et al.] // Neuro Oncol. – 2022. – Vol. 24, № 8. – P. 1318–1330.
59. Brown, D.V. Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies proneural and mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme / D.V. Brown, P.M. Daniel, G.M. D'Abaco [et al.] // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6, № 8. – P. 6267–80.
60. 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, [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 2. – 17 p.
61. Bryukhovetskiy, A. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue-

- specific stem cells of humans / A. Bryukhovetskiy, V. Shevchenko, S. Kovalev, [et al.] // *Cell Transplant.* – 2014. – Vol. 23. – P. 151–170.
62. Bryukhovetskiy, I. Cell-based immunotherapy of glioblastoma multiforme / I. Bryukhovetskiy // *Oncol Lett.* – 2022. – Vol. 23, № 4. – P. 133.
63. Bryukhovetskiy, I. Glioblastoma and bone marrow stem cells / I. Bryukhovetskiy, A. Bryukhovetskiy, Y. Khotimchenko [et al.] // FEFU Publishing House. – 2020. – 254 p.
64. Bryukhovetskiy, I.S. Hematopoietic stem cells as a tool for the treatment of glioblastoma multiforme / I.S. Bryukhovetskiy, I.V. Dyuzhen, V.E. Shevchenko, [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2016. – Vol. 14, № 5. – P. 4511–4520.
65. Capper, D. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience / D. Capper, D. Stichel, F. Sahm, [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2018. – Vol. 136, № 2. – P. 181–210.
66. Caramanna, I. Corticosteroids use and neurocognitive functioning in patients with recurrent glioblastoma: Evidence from European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) trial 26101 / I. Caramanna, J.M. de Kort, A.A. Brandes, [et al.] // *Neurooncol Pract.* – 2022. – Vol. 9, №4. – P. 310–316.
67. Castellani, G. Transforming the understanding of brain immunity / G. Castellani, T. Croese, J.M. Ramos, [et al.] // *Science.* – 2023. – Vol. 380.
68. Chen, J. Clinical characteristics of glioblastoma with metastatic spinal dissemination / J. Chen, Q. Shi, S. Li, [et al.] // *Ann Palliat Med.* – 2022. – Vol. 11, № 2. – P. 506–512.
69. Chen, Z. FOSL1 promotes proneural-to-mesenchymal transition of glioblastoma stem cells via UBC9/CYLD/NF- κ B axis / Z. Chen, S. Wang, H.L.Li, [et al.] // *Mol Ther.* – 2022. – Vol. 30, № 7. – P. 2568–2583.
70. Choe, J.H. SynNotch-CAR T cells overcome challenges of specificity, heterogeneity, and persistence in treating glioblastoma / J.H. Choe, P.B.

- Watchmaker, M.S. Simic, [et al.] // *Sci Transl Med.* – 2021. – Vol. 13, № 591. – 8 p.
71. Cloughesy, T. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Phase II Study of Onartuzumab Plus Bevacizumab Versus Placebo Plus Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: Efficacy, Safety, and Hepatocyte Growth Factor and O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Biomarker Analyses / T. Cloughesy, G. Finocchiaro, C. Belda-Iniesta, [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2017. – Vol. 35, № 3. – P.343–351.
72. Cloughesy, T.F. Phase II study of cabozantinib in patients with progressive glioblastoma: subset analysis of patients with prior antiangiogenic therapy / T.F. Cloughesy, J. Drappatz, J. de Groot, [et al.] // *Neuro Oncol.* – 2018. – Vol. 20, №2. – P. 259–267.
73. Coelho, B.P. Multifaceted WNT Signaling at the Crossroads Between Epithelial-Mesenchymal Transition and Autophagy in Glioblastoma / B.P. Coelho, C.F.L. Fernandes, J.M. Boccacino, [et al.] // *Front Oncol.* – 2020. – Vol 10. – 17 p.
74. Cortez, M.A. PDL1 Regulation by p53 via miR-34 / M.A. Cortez, C. Ivan, D. Valdecanas [et al.] // *J Natl Cancer Inst.* – 2015. – Vol. 108, № 1. – 9 p.
75. Couturier, C.P. Glioblastoma scRNA-seq shows treatment-induced, immune-dependent increase in mesenchymal cancer cells and structural variants in distal neural stem cells / C.P. Couturier, J. Nadaf, Z. Li, [et al.] // *Neuro Oncol.* – 2022. – Vol. 24, № 9. – P. 1494–1508.
76. Crunkhorn, S. Targeting drug-resistant glioblastoma / S. Crunkhorn // *Nat Rev Drug Discov.* – 2022. – Vol. 21, № 10. – P. 7-11.
77. Datong, S. Forkhead box protein O3a promotes glioma cell resistance to temozolomide by regulating matrix metalloproteinase and β -catenin / S. Datong, Y. Shenghui, Z. Xufeng, [et al.] // *Oncol Lett.* – 2021. – Vol. 4, № 328.
78. De Biase, G. Perioperative Management of Patients with Glioblastoma/ G. De Biase, D.P. Garcia, A. Bohnen // *Neurosurg Clin N Am.* – 2021. – Vol. 32, № 1. – P. 1–8.

79. De Leo, A. Myeloid Cells in Glioblastoma Microenvironment / A. De Leo, A. Ugolini, F. Veglia, [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – 20 p.
80. Delavar, A. Racial and ethnic disparities in brain tumour survival by age group and tumour type / A. Delavar, A.R. Wali, D.R. Santiago-Dieppa, [et al.] // *Br J Neurosurg*. – 2022. – Vol. 36, № 6. – P. 705–711.
81. Dolina, J.S. CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer / J.S. Dolina, N. Van Braeckel-Budimir, G.D. Thomas, [et al.] // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12. – 13 p.
82. Drakulic, D. Current Opportunities for Targeting Dysregulated Neurodevelopmental Signaling Pathways in Glioblastoma / D. Drakulic, M. Schwirtlich, I. Petrovic, [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 16. – P.25–30.
83. Ensenyat-Mendez, M. iGlioSub: an integrative transcriptomic and epigenomic classifier for glioblastoma molecular subtypes / M. Ensenyat-Mendez, S. Íñiguez-Muñoz, B. Sesé, [et al.] // *BioData Min*. –2021. – Vol 14, №1. – P. 42.
84. Fan, D. Reprogramming the immunosuppressive microenvironment of IDH1 wild-type glioblastoma by blocking Wnt signaling between microglia and cancer cells / D. Fan, Q. Yue, J. Chen, [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2021. – Vol. 10, № 1. – 13 p.
85. Fargeas, C.A. Commentary: Could We Address the Interplay Between CD133, Wnt/ β -Catenin, and TERT Signaling Pathways as a Potential Target for Glioblastoma Therapy? / C.A. Fargeas, A. Lorico, D. Corbeil // *Front Oncol*. – 2021. – Vol. 11. – 4 p.
86. Fedele, M. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma / M. Fedele, L. Cerchia, S. Pegoraro [et al] // *Int J Mol Sci*. –2019. – Vol. 20, № 11. – 14 p.
87. French, R. Epigenetic regulation of cancer stem cell formation and maintenance / R. French, S. Pauklin // *Int J Cancer*. – 2021. – Vol. 148, № 12. – P. 2884–2897.
88. Gao, L. TMEM2 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes resistance to temozolomide in GBM cells / L. Gao, S. Tong, J Liu, [et al.] // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 24, № 6. – 12 p.

89. Gao, Z. PDIA3P1 promotes Temozolomide resistance in glioblastoma by inhibiting C/EBP β degradation to facilitate proneural-to-mesenchymal transition / Z. Gao, J. Xu, Y. Fan, [et al.] // *J Exp Clin Cancer Res.* –2022. – Vol. 41, № 1. – 8 p.
90. Garofano, L. Pathway-based classification of glioblastoma uncovers a mitochondrial subtype with therapeutic vulnerabilities / L. Garofano, S. Migliozi, Y.T. Oh, [et al.] // *Nat Cancer.* –2021. – Vol. 2, № 2. – P. 141–156.
91. Gatto, L. Engineered CAR-T and novel CAR-based therapies to fight the immune evasion of glioblastoma: gutta cavat lapidem / L. Gatto, E. Franceschi, V. Di Nunno, [et al.] // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2021. – Vol. 21, № 12. – P. 1333–1353.
92. Geribaldi-Doldán, N. The Role of Microglia in Glioblastoma / N. Geribaldi-Doldán, C. Fernández-Ponce, R.N. Quiro, [et al.] // *Front Oncol.* – 2021. – Vol. 10. – P. 603495.
93. Ghouzlani, A. Immune Checkpoint Inhibitors in Human Glioma Microenvironment / A. Ghouzlani, S. Kandoussi, M.Tall, [et al.] // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – 10 p.
94. Gimple, R.C. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer / R.C. Gimple, S. Bhargava, D. Dixit, [et al.] // *Genes Dev.* – 2019. – Vol. 33, № 11-12. – P. 591–609.
95. Giordano, F.A. Targeting the Post-Irradiation Tumor Microenvironment in Glioblastoma via Inhibition of CXCL12 / FA Giordano, B. Link, M. Glas, [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11, № 3. – 17 p.
96. Goel, N.J. Economic implications of the modern treatment paradigm of glioblastoma: an analysis of global cost estimates and their utility for cost assessment / N.J. Goel, C.E. Bird, W.H. Hicks, [et al.] // *J Med Econ.* – 2021. – Vol. 24, №1. – P. 1018–1024.
97. Grobber, B. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion / B. Grobber, P.P. De Deyn, H. Slegers // *Cell Tissue Res.* – 2002. – Vol. 310, № 3. – P. 257–270.

98. Hadizadeh, M. Novel targets to overcome antiangiogenesis therapy resistance in glioblastoma multiforme: Systems biology approach and suggestion of therapy by galunisertib / M. Hadizadeh, S. Parvizpour, S. Ghasemi // *Cell Biol Int.* – 2022. – Vol. 46, № 10. – P. 1649–1660.
99. Hajikhani, B. Clofazimine susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium abscessus*: a meta-analysis study / B. Hajikhani, M.J. Nasiri, S.S. Hosseini, [et al.] // *J Glob Antimicrob Resist.* – 2021. – Vol. 26. – P. 188–193.
100. Hao, J. Sema3C signaling is an alternative activator of the canonical WNT pathway in glioblastoma / J. Hao, X. Han, H. Huang, [et al.] // *Nat Commun.* – 2023. – Vol. 14, № 1. – 12 p.
101. He, C. FOXO3a protects glioma cells against temozolomide-induced DNA double strand breaks via promotion of BNIP3-mediated mitophagy / C. He, S. Lu, X.Z. Wang, [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* – 2021. – Vol. 42, № 8. – P.1324–1337.
102. Hefni, A.M. CD133 is an independent predictive and prognostic marker in metastatic breast cancer / A.M. Hefni, A.M. Sayed, M.T. Hussien, [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2022. – Vol 35, № 2. – P. 207–215.
103. Herrera-Rios, D. A computational guided, functional validation of a novel therapeutic antibody proposes Notch signaling as a clinical relevant and druggable target in glioma / D. Herrera-Rios, G. Li, D. Khan, [et al.] // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – 12 p.
104. Herrlinger, U. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial / U. Herrlinger, T. Tzaridis, F. Mack, [et al.] // *Lancet.* – 2019. – Vol. 393. – P. 678–688.
105. Herrlinger, U. News on the horizon in glioblastoma therapy / U. Herrlinger // *ESMO Open.* – 2020. – Vol.1. – 1p.

106. Herz, J. Morphological and Functional Analysis of CNS-Associated Lymphatics / J. Herz, A. Louveau, S. Da Mesquita, [et al.] // *Methods Mol Biol.* – 2018. – Vol. 1846. – P. 141–151.
107. Hsu, S.Y. Phenethyl Isothiocyanate Suppresses the Proinflammatory Cytokines in Human Glioblastoma Cells through the PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathway In Vitro / S.Y. Hsu, S.C. Lee, H.C. Liu, [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2022. – 2108289.
108. Huang, S. The HIF-1 α /miR-224-3p/ATG5 axis affects cell mobility and chemosensitivity by regulating hypoxia-induced protective autophagy in glioblastoma and astrocytoma / S. Huang, P. Qi, T. Zhang, [et al.] // *Oncol Rep.* – 2019. – Vol. 41, № 3. – P. 1759–1768.
109. Huang, W. Inhibition of Bevacizumab-induced Epithelial-Mesenchymal Transition by BATF2 Overexpression Involves the Suppression of Wnt/ β -Catenin Signaling in Glioblastoma Cells / W. Huang, C. Zhang, M. Cui, [et al.] // *Anticancer Res.* – 2017. – Vol 37, № 8. – P. 4285–4294.
110. Huang, X.J. Dihydroartemisinin potentiates the cytotoxic effect of temozolomide in rat C6 glioma cells / X.J. Huang, C.T. Li, W.P. Zhang, [et al.] // *Pharmacology.* – 2008. – Vol. 82, № 1. – P. 1–9.
111. Huang, M. Wnt-mediated endothelial transformation into mesenchymal stem cell-like cells induces chemoresistance in glioblastoma / M. Huang, D. Zhang, J.Y. Wu, [et al.] // *Sci Transl Med.* – 2020. – Vol. 26, № 12. – 15 p.
112. Hubert C.G. Seeing the GBM diversity spectrum / C.G. Hubert, J.D. Lathia // *Nat Cancer.* – 2021. – Vol. 2, № 2. – P. 135–137.
113. Hwang, K. The Combination PARP Inhibitor Olaparib with Temozolomide in an Experimental Glioblastoma Model / K. Hwang, J.H. Lee, S.H. Kim, [et al.] // *In Vivo.* – 2021. – Vol. 35, № 4. – P. 2015–2023.
114. Jatyan, R. Temozolomide-fatty acid conjugates for glioblastoma multiforme: In vitro and in vivo evaluation / R. Jatyan, D.K. Sahel, P. Singh, [et al.] // *J Control Release.* – 2023. – Vol. 359. – P. 161–174.

115. Jhanwar-Uniyal, M. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship / M. Jhanwar-Uniyal, J.V. Wainwright, A.L. Mohan, [et al.] // *Adv Biol Regul.* – 2019. – Vol. 72. – P. 51–62.
116. K, Lv. Selective enrichment of CD133+/SOX2+ glioblastoma stem cells via adherent culture / Lv K, Chen Z, X. Zhang // *Oncol Lett.* – 2018. – Vol. 16, № 4. – P. 4567–4576.
117. Kaley, T.J. Phase I clinical trial of temsirolimus and perifosine for recurrent glioblastoma / T.J. Kaley, K.S. Panageas, E.I. Pentsova, [et al.] // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2020. – Vol. 7, № 4. – P.429–436.
118. Kast, R.E. Adding high-dose celecoxib to increase effectiveness of standard glioblastoma chemoradiation / R.E. Kast // *Ann Pharm Fr.* – 2021. – Vol. 79, № 5. –P. 481–488.
119. Kast, R.E. Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: Potential therapeutic benefit from dapsone, fenofibrate, and ribavirin / R.E. Kast, Q.A. Hill, D. Wion, [et al] // *Tumour Biol.* – 2017. – Vol. 39, № 5. – 10 p.
120. Ke, X. FoxO3a mediates glioma cell invasion by regulating MMP9 expression / X. Ke, P. Hua, Z. Zhenhao, [et al.] // *Oncol Rep.* – 2016. – Vol. 36, № 5. – P. 3044–3050.
121. Ke, X. MiR-514a-3p inhibits cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting EGFR in clear cell renal cell carcinoma / X. Ke, X. Zeng, X. Wei, [et al] // *Am J Transl Res.* – 2017. – Vol. 9, № 12. – P. 5332–5346.
122. Keskin, D.B. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial / D.B. Keskin, A.J. Anandappa, J. Sun, [et al.] // *Nature.* – 2019. – Vol. 565, № 7738. – P.234–239.
123. Keswani, R.K. Repositioning Clofazimine as a Macrophage-Targeting Photoacoustic Contrast Agent / R.K. Keswani, C. Tian, T. Peryea, [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – 8 p.

124. Khan, A.B. CXCR4 expression is associated with proneural-to-mesenchymal transition in glioblastoma / A.B. Khan, S. Lee, A.S. Harmanci, [et al.] // *Int J Cancer*. – 2023. – Vol. 152, № 4. –P. 713–724.
125. Khan, F. Macrophages and microglia in glioblastoma: heterogeneity, plasticity, and therapy / F. Khan, L. Pang, M. Dunterman, [et al.].] // *J Clin Invest*. – 2023. – Vol. 133, № 1. – 12 p.
126. Khan, L. External beam radiation dose escalation for high grade glioma / L. Khan, H. Soliman, A. Sahgal, [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev*. –2020. – Vol. 21, № 5. – 50 p.
127. Kim, J.Y. Sorafenib increases tumor treating fields-induced cell death in glioblastoma by inhibiting STAT3 / J.Y. Kim, Y. Jo, H.K. Am, [et al.] // *J Cancer Res*. – 2020. – Vol. 10, № 10. – P. 3475–3486.
128. Klement, R.J. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma in part through their elevation of blood glucose levels / R.J. Klement, C.E. Champ // *Brain*. – 2017. – Vol. 140, № 3. – 2 p.
129. Kut, C. Radiotherapy, lymphopenia and improving the outcome for glioblastoma: a narrative review / C. Kut, L. Kleinberg // *Chin Clin Oncol*. – 2023. – Vol. 12, № 1. – 4 p.
130. Laprie, A. Radiation dose intensification for glioblastoma / A. Laprie, F. Tensaouti, E. Moyal // *Cancer Radiother*. – 2022. – Vol. 26, № 6-7. – P. 894–898.
131. Lassman, A.B. Depatuxizumab mafodotin in EGFR-amplified newly diagnosed glioblastoma: A phase III randomized clinical trial / A.B. Lassman, S.L. Pugh, T.J.C. Wang, [et al.] // *Neuro Oncol*. – 2023. – Vol. 25, № 2. – P.339–350.
132. Latour, M. WNT Signaling as a Therapeutic Target for Glioblastoma / M. Latour, N.G. Her, S Kesari, [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22, № 16. – 14 p.
133. Lauko, A. Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors / A. Lauko, A. Lo, M.S. Ahluwalia // *Semin Cancer Biol*. – 2022. – Vol. 82. – P.162–175.

134. Lewellis, S.W. Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations / S.W. Lewellis, H. Knaut // *Cell Dev Biol.* – 2012. – Vol. 23, № 3. – P. 333–40.
135. Li, H. Pyrvinium pamoate regulates MGMT expression through suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway to enhance the glioblastoma sensitivity to temozolomide / H. Li, S. Liu, R. Jin, [et al.] // *Cell Death Discov.* – 2021. – Vol. 7, № 1. – 12 p.
136. Li, H. Therapeutic effects of antibiotic drug tigecycline against cervical squamous cell carcinoma by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling / H. Li, S. Jiao, X. Li, [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. – Vol. 467, № 1. – P. 14–20.
137. Li, L. Dendritic cell vaccines for glioblastoma fail to complete clinical translation: Bottlenecks and potential countermeasures / L. Li, J. Zhou, X. Dong, [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2022. – Vol. 109. –
138. Li, S. RSL3 Drives Ferroptosis through NF- κ B Pathway Activation and GPX4 Depletion in Glioblastoma / S. Li, Y. He, K. Chen, [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2021. – P. 2915019.
139. Liang, C. Multiple subtentorial metastasis in diffuse midline glioma receiving tumor treating fields: a case report and literature review / C. Liang, J. Gong, B. Zhang, [et al.] // *Ann Transl Med.* – 2021. – Vol. 9, № 20. – P. 1604.
140. Liao, L.M. Association of Autologous Tumor Lysate-Loaded Dendritic Cell Vaccination With Extension of Survival Among Patients With Newly Diagnosed and Recurrent Glioblastoma: A Phase 3 Prospective Externally Controlled Cohort Trial / L.M. Liao, K. Ashkan, S. Brem, [et al.] // *JAMA Oncol.* – 2023. – Vol. 9, № 1. – P. 112–121.
141. Liao, L.M. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma / L.M. Liao, K. Ashkan, D.D. Tran, [et al.] // *J Transl Med.* – 2018. – Vol. 16, № 1. – 15p.

142. Lim, M. Current state of immunotherapy for glioblastoma / M. Lim, Y. Xia, C. Bettegowda, [et al.] // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2018. – Vol. 15, № 7. –P. 422–442.
143. Lim, M. Phase III trial of chemoradiotherapy with temozolomide plus nivolumab or placebo for newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter / M. Lim, M. Weller, A. Idbaih, [et al.] // *Neuro Oncol.* – 2022. –Vol. 24, № 11. –P. 1935–1949.
144. Lin Z. Effective treatment of a BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma patient by vemurafenib: a case report / Z. Lin, H. Xu, R. Yang, [et al.] // *Anticancer Drugs.* – 2022. – Vol. 33, № 1. –P. 100–104.
145. Liu J. Hypoxia induced ferritin light chain (FTL) promoted epithelia mesenchymal transition and chemoresistance of glioma / J. Liu, L. Gao, N. Zhan, [et al.] // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2020. – Vol 39, № 137. – P. 32.
146. Liu N. Role of telomerase in the tumour microenvironment / N. Liu, X.H. Guo, J.P. Liu, [et al.] // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2020. –Vol. 47, № 3. – P. 357–364.
147. Liu, Y. Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress / Y. Liu, S. Fang, Q. Sun, [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2016. – Vol. 480, № 3. – P. 415–421.
148. 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, [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2016. – Vol. 131, № 6. – P. 803–820.
149. Lu, V.M. Survival Benefit of Maximal Resection for Glioblastoma Reoperation in the Temozolomide Era: A Meta-Analysis / V.M. Lu, A. Goyal, C.S. Graffeo, [et al.] // *World Neurosurg.* – 2019. – Vol. 1, № 27. – P. 31–37.
150. Luo, C. The prognosis of glioblastoma: a large, multifactorial study / C. Luo, K. Song, S. Wu [et al.] // *Br J Neurosurg.* –2021. – Vol. 35, №5. – P. 555-561.

151. Maggs, L. CAR T Cell-Based Immunotherapy for the Treatment of Glioblastoma / L. Maggs, G. Cattaneo, A.E. Dal, [et al.] // *Front Neurosci.* – 2021. – Vol. 15. – P. 662064.
152. Malouff, T.D. Boron Neutron Capture Therapy: A Review of Clinical Applications / T.D. Malouff, D.S. Seneviratne, D.K. Ebner, [et al.] // *Front Oncol.* – 2021. – Vol. 11. – 10 p.
153. Manoranjan, B. A CD133-AKT-Wnt signaling axis drives glioblastoma brain tumor-initiating cells / B. Manoranjan, C. Chokshi, C. Venugopal, [et al.] // *Oncogene.* – 2020. – Vol. 39, № 7. – P. 1590–1599.
154. Mathen, P. Radiosensitizers in the temozolomide era for newly diagnosed glioblastoma / P. Mathen, L. Rowe, M. Mackey, [et al.] // *Neurooncol Pract.* – 2020. – Vol. 7, № 3. – P. 268–276.
155. Matias, D. Microglia-glioblastoma interactions: New role for Wnt signaling / D. Matias, D. Predes, P. Niemeyer Filho, [et al.] // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* – 2017. – Vol. 1868, № 1. – P. 333–340.
156. Medikonda, R. A review of glioblastoma immunotherapy / R. Medikonda, G. Dunn, M. Rahman, [et al.] // *J Neurooncol.* – 2021. – Vol. 151, № 1. – P. 41–53.
157. Meister, H. Multifunctional mRNA-Based CAR T Cells Display Promising Antitumor Activity Against Glioblastoma / H. Meister, T. Look, P. Roth, [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2022. – Vol. 28, № 21. – P. 4747–4756.
158. Melhem, J.M. Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma / J.M. Melhem, J. Detsky, M.J. Lim-Fat, [et al.] // *Neurotherapeutics.* – 2022. – Vol. 19, № 6. – P. 1705–1723.
159. Mizrak, D. CD133: molecule of the moment / D Mizrak, Brittan, M Alison // *M. J Pathol.* – 2008. – Vol. 214, № 1. – P. 3–9.
160. Moitra, P. Temozolomide-induced myelotoxicity and single nucleotide polymorphisms in the MGMT gene in patients with adult diffuse glioma: a single-institutional / P. Moitra, A. Chatterjee, P.K. Kota, [et al.] // *J Neurooncol.* – 2022. – Vol. 156, № 3. – P. 625–634.

161. Montaldi, A.P. Methoxyamine sensitizes the resistant glioblastoma T98G cell line to the alkylating agent temozolomide / A.P. Montaldi, E.T. Sakamoto-Hojo // *Clin Exp Med.* – 2013. – Vol. 13, № 4. –P. 279–288.
162. Montemurro, N. Macrophages in Recurrent Glioblastoma as a Prognostic Factor in the Synergistic System of the Tumor Microenvironment / N. Montemurro, B. Pahwa, A Tayal, [et al.] // *Neurol Int.* – 2023. – Vol. 15, № 2. – P. 595–608.
163. Morris, L.G. The FAT epidemic: a gene family frequently mutated across multiple human cancer types / L.G. Morris, D. Ramaswami, T.A. Chan // *Cell Cycle.* – 2013. – Vol. 12, № 7. – P. 1011–2.
164. Navone, S.E. Aspirin Affects Tumor Angiogenesis and Sensitizes Human Glioblastoma Endothelial Cells to Temozolomide, Bevacizumab, and Sunitinib, Impairing Vascular Endothelial Growth Factor-Related Signaling / S.E. Navone, L. Guarnaccia, C. Cordiglieri, [et al.] // *World Neurosurg.* – 2018. – Vol. 120. –P. 380–391.
165. Neftel C. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma / C. Neftel, J. Laffy, M.G. Filbin, [et al.] // *Cell.* – 2019. – Vol. 178, № 4. – P. 835–849.
166. Nguyen T.T.T. HDAC inhibitors elicit metabolic reprogramming by targeting super-enhancers in glioblastoma models / T.T.T. Nguyen, Y. Zhang, E. Shang, [et al.] // *J Clin Invest.* – 2020. – Vol. 130, № 7. – P. 3699–3716.
167. Oliver, L. Drug resistance in glioblastoma: are persisters the key to therapy? / L. Oliver, L. Lalier, C. Salaud // *Cancer Drug Resist.* – 2020. – Vol. 3, №3. – P. 287-301.
168. Omuro, A. Immune-checkpoint inhibitors for glioblastoma: what have we learned / A. Omuro // *Arq Neuropsiquiatr.* – 2022. – Vol. 80, № 5. – P.266–269.
169. Padovan, M. Depatuxizumab Mafodotin (Depatux-M) Plus Temozolomide in Recurrent Glioblastoma Patients: Real-World Experience from a Multicenter Study of Italian Association of Neuro-Oncology (AINO) / M. Padovan, M. Eoli, A. Pellerino, [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2021. – Vol. 13, № 11. – 10 p.

170. Pantovic, A. In vitro antiglioma action of indomethacin is mediated via AMP-activated protein kinase/mTOR complex 1 signalling pathway / A. Pantovic, M. Bosnjak, K. Arsikin, [et al.] // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2017. – Vol. 83. – P. 84–96.
171. Park, A.K. Characterization and prognosis of temozolomide-induced aplastic anemia in patients with central nervous system malignancies / A.K. Park, A. Waheed, D.A. Forst // *Neuro Oncol.* – 2022. – Vol. 24, № 6. – P. 964–973.
172. Park, J. Role of CD133/NRF2 Axis in the Development of Colon Cancer Stem Cell-Like Properties / J. Park, S.K. Kim, S.P. Hallis, [et al.] // *Front Oncol.* – 2022. – Vol. 11. – P. 808300.
173. Park, L. A Case of Lepromatous Leprosy With Erythema Nodosum Leprosum / L. Park, C.E. Wallace, G. Vasile, [et al.] // *Cureus.* – 2023. – Vol. 15, № 1. – 5p.
174. Pitter, K.L. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma / K.L. Pitter, I. Tamagno, K. Alikhanyan, [et al.] // *Brain.* – 2016. – Vol. 139, № 5. – P. 1458–71.
175. Precilla, D.S. Wnt/ β -catenin Antagonists: Exploring New Avenues to Trigger Old Drugs in Alleviating Glioblastoma Multiforme / D.S. Precilla, S.S. Kuduvalli, M. Purushothaman, [et al.] // *Curr Mol Pharmacol.* – 2022. – Vol. 15, №2. – P. 338–360.
176. Qiu, J. Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme / J. Qiu, Z. Shi, J. Jiang // *Drug Discov Today.* – 2017. – Vol. 22, № 1. – P. 148–156.
177. Rajakulendran, N. Wnt and Notch signaling govern self-renewal and differentiation in a subset of human glioblastoma stem cells / N. Rajakulendran, K.J. Rowland, H.J. Selvadurai, [et al.] // *Genes Dev.* – 2019. – Vol. 33, № 9-10. – P. 498–510.
178. Reardon, D.A. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial / D.A. Reardon, A. A. Brandes, A. Omuro // *JAMA Oncol.* – 2020. – Vol. 6, № 7. – P. 1003–1010.

179. Reardon, D.A. Rindopepimut with Bevacizumab for Patients with Relapsed EGFRvIII-Expressing Glioblastoma (ReACT): Results of a Double-Blind Randomized Phase II Trial / D.A. Reardon, A. Desjardins, J.J. Vredenburgh, [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2020. – Vol. 26, № 7. – P. 1586–1594.
180. Richards, L.M. Gradient of Developmental and Injury Response transcriptional states defines functional vulnerabilities underpinning glioblastoma heterogeneity / L.M. Richards, O.K.N. Whitley, G. MacLeod, [et al.] // *Nat Cancer.* – 2021. – Vol 2, № 2. – P. 157–173.
181. Rim, E.Y. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators / E.Y. Rim, H. Clevers, R. Nusse // *Annu Rev Biochem.* – 2022. – Vol. 91. – P. 571–598.
182. Rizzino, A. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis / A. Rizzino, E.L. Wuebben // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – Vol. 1859. – P. 780–791.
183. Robin, A.M. Reoperation for Recurrent Glioblastoma Multiforme/ A.M. Robin, I. Lee, S.N. Kalkanis // *Neurosurg Clin N Am.* – 2017. – Vol. 28, № 3. – P. 407–428.
184. Rodríguez-Gómez, J.A. Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response / J.A. Rodríguez-Gómez, E. Kavanagh, P. Engskog-Vlachos, [et al.] // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, № 7. – 46 p.
185. Rosenthal, M. Buparlisib plus carboplatin or lomustine in patients with recurrent glioblastoma: a phase Ib/II, open-label, multicentre, randomised study / M. Rosenthal, P.M. Clement, M. Campone, [et al.] // *ESMO Open.* – 2020. – Vol. 5, № 4.
186. Rostomily, R.C. Expression of neurogenic basic helix-loop-helix genes in primitive neuroectodermal tumors / R.C. Rostomily, O. Bermingham-McDonogh, M.S. Berger, [et al.] // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57, №16. – P. 3526-3531.

187. Ryan, J.T. Functional brain imaging interventions for radiation therapy planning in patients with glioblastoma: a systematic review / J.T. Ryan, M. Nakayama, I. Gleeson, [et al.] // *Radiat Oncol.* – 2022. – Vol. 17, № 1. – P. 178.
188. Saito, T. Prognostic importance of temozolomide-induced neutropenia in glioblastoma, IDH-wildtype patients / T. Saito, K. Sugiyama, S. Hama, [et al.] // *Neurosurg Rev.* – 2018. – Vol. 41, № 2. – P. 621–628.
189. Sareddy, G.R. PELP1 promotes glioblastoma progression by enhancing Wnt/ β -catenin signaling / G.R. Sareddy, U.P. Pratap, S. Viswanadhapall, [et al.] // *Neurooncol Adv.* – 2019. – Vol. 1.
190. Sautter, L. Open-Label Phase II Evaluation of Imatinib in Primary Inoperable or Incompletely Resected and Recurrent Glioblastoma / L. Sautter, R. Hofheinz, J. Tuettenberg [et al.] // *Oncology.* – 2020. – Vol. 98, № 1. – P.16–22.
191. Schaff, L.R. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review / L.R. Schaff, I.K. Mellinshoff // *JAMA.* – 2023. – Vol. 329, № 7. – P. 574–587.
192. Schiff, D. Phase 1/2 trial of temsirolimus and sorafenib in the treatment of patients with recurrent glioblastoma: North Central Cancer Treatment Group Study/Alliance N0572 / D. Schiff, K.A. Jaeckle, S.K. Anderson, [et al.] // *Cancer.* – 2018. – Vol. 124, № 7. – P.1455–1463.
193. Shah, A.H. Survival benefit of lobectomy for glioblastoma: moving towards radical supramaximal resection / A.H. Shah, A. Mahavadi, L. Di [et al.] // *J Neurooncol.* – 2020. – Vol. 148, №3. –P. 501–508.
194. Shahcheraghi, S.H. Wnt/beta-catenin and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways in Glioblastoma: Two Main Targets for Drug Design / S.H. Shahcheraghi, V. Tchokonte-Nana, M. Lotfi, [et al.] // *A Review. Curr Pharm Des.* – 2020. – Vol. 26, № 15. – P. 1729–1741.
195. Shevchenko, V. Proteins of the Wnt signaling pathway as targets for the regulation of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma / V. Shevchenko, N. Arnotskaya, M. Korneyko, [et al.] // *Oncol Rep.* – 2019. – Vol. 41, № 5. – P. 3080–3088.

196. Shevchenko, V. Proteins of Wnt signaling pathway in cancer stem cells of human glioblastoma / V. Shevchenko, N. Arnotskaya, S. Zaitsev, [et al.] // *Int Rev Neurobiol.* – 2020. – Vol. 151. – P. 185–200.
197. Silber, J. miR-34a repression in proneural malignant gliomas upregulates expression of its target PDGFRA and promotes tumorigenesis. / J. Silber, A. Jacobsen, T. Ozawa, [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 3. – 9p.
198. Steponaitis, G. Mesenchymal and Proneural Subtypes of Glioblastoma Disclose Branching Based on GSC Associated Signature / G. Steponaitis, A. Tamasauskas // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 9. – P.49–64.
199. Stupp, R. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial / R. Stupp, M.E. Hegi, W.P. Mason [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2009. – Vol. 10, № 5. – P. 459–466.
200. Swain N. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis / N. Swain, M. Thakur, J. Pathak [et al.] // *J Oral Maxillofac Pathol.* – 2020. – Vol. 24, № 2. – P.368–373.
201. Tan A.C. Management of glioblastoma: State of the art and future directions / A.C. Tan, D.M. Ashley, G.Y. López [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2020. – Vol. 70, № 4. – P. 299–312.
202. Tang, C. Gene mutation profiling of primary glioblastoma through multiple tumor biopsy guided by 1H-magnetic resonance spectroscopy / C. Tang, J. Guo, H. Chen [et al.] // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – Vol. 8, № 5. – P. 5327–5335.
203. Tao, W. Dual Role of WISP1 in maintaining glioma stem cells and tumor-supportive macrophages in glioblastoma / W. Tao, C. Chu, W. Zhou [et al.] // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 30-15.
204. Thomas, R.P. Macrophage Exclusion after Radiation Therapy (MERT): A First in Human Phase I/II Trial using a CXCR4 Inhibitor in Glioblastoma / R.P. Thomas, S. Nagpal, M. Iv [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2019. – Vol. 25, № 23. – P. 6948–6957.

205. Torrealba, N. TGF- β /PI3K/AKT/mTOR/NF- κ B pathway. Clinicopathological features in prostate cancer / N. Torrealba, R. Vera, B. Fraile [et al.] // –2020. – Vol. 23, № 5. – P.801–811.
206. Trexel, J. Macrophage-Mediated Clofazimine Sequestration Is Accompanied by a Shift in Host Energy Metabolism / J. Trexel, G.S. Yoon, R.K. Keswani, [et al.] // J Pharm Sci. – 2017. – Vol. 106, № 4. – P. 1162–1174.
207. Tsai, C.Y. NBM-BMX, an HDAC8 Inhibitor, Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme by Downregulating the β -Catenin/c-Myc/SOX2 Pathway and Upregulating p53-Mediated MGMT Inhibition / C.Y. Tsai, H.J. Ko, S.J. Chiou, [et al.] // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, № 11. – 18 p.
208. Upraity, S. MiR-224 expression increases radiation sensitivity of glioblastoma cells / S. Upraity, S Kazi, V. Padul // Biochem Biophys Res Commun. – 2014. – Vol. 448, № 2. – P.225-230.
209. Verdugo, E. An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment / E. Verdugo, I. Puerto, M.Á. Medina // Cancer Commun (Lond). – 2022. Vol. 42, № 11. – P. 1083–1111.
210. 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, [et al.] // Cancer Cell. – 2010. – Vol. 17, № 1. – P. 98–110.
211. Vogelius, I.R. Bentzen Proton vs photon radiation therapy for glioblastoma: Maximizing information from trial / I.R. Vogelius, S.M. Bentzen // Neuro Oncol. – 2022. – Vol. 24, № 5. – P. 849–850.
212. Walcher, L. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies / L. Walcher, A.K. Kistenmacher, H. Suo, [et al.] // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 12-80.
213. Wang, D. Chlorotoxin-directed CAR T cells for specific and effective targeting of glioblastoma / D. Wang, R. Starr, W.C. Chang, [et al.] // Sci Transl Med. – 2020. – Vol. 12, № 533. – 14 p.

214. Wang, G. CXCL11-armed oncolytic adenoviruses enhance CAR-T cell therapeutic efficacy and reprogram tumor microenvironment in glioblastoma / G. Wang, Z. Zhang, K. Zhong, [et al.] // *Mol Ther.* – 2023. – Vol. 31, № 1. – P. 134–153.
215. Wang G. Tumor-associated microglia and macrophages in glioblastoma: From basic insights to therapeutic opportunities / G. Wang, K. Zhong, Z. Wang, [et al.] // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – 12p.
216. Wang, J. Vaccination with Designed Neopeptides Induces Intratumoral, Cross-reactive CD4+ T-cell Responses in Glioblastoma / J. Wang, T Weiss, M.C. Neidert, [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2022. – Vol. 28, № 24. – P. 5368–5382.
217. Wang, L.B. Proteogenomic and metabolomic characterization of human glioblastoma / L.B. Wang, A. Karpova, M.A. Gritsenko, [et al.] // *Cancer Cell.* – 2021. – Vol. 39, № 4. – P. 509–528. – 12 p.
218. Wang, Q. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment / Q. Wang, B. Hu, X. Hu, [et al.] // *Cancer Cell.* – 2017. – Vol. 32, № 1. – P. 42–56.
219. Wang, S. The CXCL12/CXCR4 axis confers temozolomide resistance to human glioblastoma cells via up-regulation of FOXM1 / S. Wang, C. Chen, J. Li, [et al.] // *J Neurol Sci.* – 2020. – Vol. 414.
220. Wang X. Sequential fate-switches in stem-like cells drive the tumorigenic trajectory from human neural stem cells to malignant glioma / X. Wang, R. Zhou, Y. Xiong, [et al.] // *Cell Res.* – 2021. – Vol. 31, № 6. – P. 684–702.
221. Wang, Z. The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments / Z. Wang, H. Zhang, S. Xu, [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 124.
222. Wen, P.Y. Phase I, open-label, multicentre study of buparlisib in combination with temozolomide or with concomitant radiation therapy and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma / P.Y. Wen, J.A Rodon, W. Mason, [et al.] // *ESMO Open.* –2020. – Vol. 5, № 4. – P. 000673.

223. Wick, A. Phase 1b/2a study of galunisertib, a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta receptor I, in combination with standard temozolomide-based radiochemotherapy in patients with newly diagnosed malignant glioma / A. Wick, A. Desjardins, C. Suarez, [et al.] // *Invest New Drugs*. – 2020. – Vol. 38, № 5. – P. 1570–1579.
224. Wieland A. Anticancer effects of niclosamide in human glioblastoma / A. Wieland, D. Trageser, S. Gogolok, [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2013. – Vol. 19, № 15. – P. 124–136.
225. Woodroffe R.W. Survival after reoperation for recurrent glioblastoma / R.W. Woodroffe, M. Zanaty, N. Soni [et al.] // *J Clin Neurosci*. – 2020. – Vol. 73. – P. 118–124.
226. Xie, X.P. Quiescent human glioblastoma cancer stem cells drive tumor initiation, expansion, and recurrence following chemotherapy / X.P. Xie, D.R. Laks, D. Sun, [et al.] // *Dev Cell*. – 2022. – Vol. 57, № 1. – P. 32–46.
227. Xu, J. Beyond TNBC: Repositioning of Clofazimine Against a Broad Range of Wnt-Dependent Cancers / J. Xu, A. Koval, V.L. Katanaev // *Front Oncol*. – 2020. – Vol. 10. – 11 p.
228. Yabo, Y.A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma / Y.A. Yabo, S.P. Niclou, A. Golebiewska // *Neuro Oncol*. – 2022. – Vol. 24, №5. – P. 669-682.
229. Yan, L. LINC00511 facilitates Temozolomide resistance of glioblastoma cells via sponging miR-126-5p and activating Wnt/ β -catenin signaling / L. Yan, T. Meng, L. Jiongbo [et al.] // *J Biochem Mol Toxicol*. – 2021. – Vol. 35, № 9. – 16 p.
230. Yang, T. PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in glioblastoma: clinical studies, challenges and potential / T. Yang, Z. Kong, W. Ma // *Hum Vaccin Immunother*. – 2021. – Vol. 17, № 2. – P. 546–553.
231. Yang, W. UBE2T Promotes Temozolomide Resistance of Glioblastoma Through Regulating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway / W. Yang, G Ge, W. Xiangpin [et al.] // *Drug Des Devel Ther*. – 2023. – Vol. 17. – P. 1357–1369.

232. Yin, D. Celecoxib reverses the glioblastoma chemo-resistance to temozolomide through mitochondrial metabolism / D. Yin, G. Jin, H. He, [et al.] // *Aging* (Albany NY). – 2021. – Vol. 13, № 17. – P. 21268–21282.
233. Ylanan, A.M.D. Intraoperative radiotherapy for glioblastoma: A systematic review of techniques and outcomes / A.M.D Ylanan, J.S.G. Pascual, E.M.D. Cruz-Lim, [et al.] // *Clin Neurosci*. – 2021. – Vol. 93. – P. 36–41.
234. Yoon, G.S. Phagocytosed Clofazimine Biocrystals Can Modulate Innate Immune Signaling by Inhibiting TNF α and Boosting IL-1RA Secretion / G.S. Yoon, S. Sud, R.K. Keswani, [et al.] // *Mol Pharm*. – 2015. – Vol 12, № 7. – P. 2517–2527.
235. Youngblood, M.W. Role of Resection in Glioblastoma Management / M.W. Youngblood, R. Stupp, A.M. Sonabend // *Neurosurg Clin N Am*. – 2021. – Vol. 32, № 1. – P.9–22.
236. Yovino, S. The etiology of treatment-related lymphopenia in patients with malignant gliomas: modeling radiation dose to circulating lymphocytes explains clinical observations and suggests methods of modifying the impact of radiation on immune cells / S. Yovino, L. Kleinberg, S.A. Grossman, [et al.] // *Cancer Invest*. – 2013. – Vol. 31, № 2. – P. 140–144.
237. Yu, T.W. Novel GM-CSF-based vaccines: One small step in GM-CSF gene optimization, one giant leap for human vaccines / T.W. Yu, H.Y. Chueh, C.C. Tsai, [et al.] // *Hum Vaccin Immunother*. – 2016. – Vol. 12, № 12. – P. 3020–3028.
238. Yuan, B. Immunotherapy of glioblastoma: Recent advances and future prospects / B. Yuan, G. Wang, X. Tang, [et al.] // *Hum Vaccin Immunother*. – 2022. – Vol. 18, № 5. – p.16
239. Yun, E.J. Stanniocalcin 2 drives malignant transformation of human glioblastoma cells by targeting SNAI2 and Matrix Metalloproteinases / E.J. Yun, D. Kim, J.T. Hsieh, [et al.] // *Cell Death Discov*. – 2022. – Vol. 8, №1. – 8p.

240. Yun, E.J. Wnt/ β -catenin signaling pathway induces autophagy-mediated temozolomide-resistance in human glioblastoma / E.J. Yun, S. Kim, J.T. Hsieh, [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11, №9. – 10 p.
241. Zaitsev, S. Pro-inflammatory modification of cancer cells microsurroundings increases the survival rates for rats with low differentiated malignant glioma of brain / S. Zaitsev, H.S. Sharma, A. Sharma, [et al.] // *Int Rev Neurobiol.* – 2020. – Vol. 151. – P. 253–279.
242. Zakaria, R. Challenges Associated with Reoperation in Patients with Glioma / R. Zakaria, J.S. Weinberg // *Neurosurg Clin N Am.* – 2021. – Vol. 32, № 1. –P. 129–135.
243. Zhang, T. Bevacizumab for recurrent glioblastoma: a systematic review and meta-analysis / T. Zhang, Q. Xin, J.M. Kang // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2021. – Vol. 25, № 21. – P. 6480–6491.
244. Zheng, Y. Lung Cancer Stem Cell Markers as Therapeutic Targets: An Update on Signaling Pathways and Therapies / Y. Zheng, L. Wang, L. Yin, [et al.] // *Front Oncol.* – 2022. – Vol. 12. – 13 p.
245. Zhu, P. Combination immunotherapy of glioblastoma with dendritic cell cancer vaccines, anti-PD-1 and poly I:C / P. Zhu, S.Y. Li, J. Ding, [et al.] // *J Pharm Anal.* – 2023. – Vol. 13, № 6. – P. 616–624.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

БСА	Бычий сывороточный альбумин
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВПСТ	Внутриклеточный путь сигнальной трансдукции
ВХТ	Высокодозная химиотерапия
ВЭЖХ- МС	Высокоэффективная жидкостная хроматография – масс- спектрометрия
ГО	Глиальные опухоли
ГСК	Гемопозитические стволовые клетки
ГЭБ	Гематоэнцефалический барьер
ДВ	Дендритные вакцины
IC50	Полуингибирующая концентрация
ГБ	Глиобластома
МСК	Мезенхимальные стволовые клетки
МНК	Мононуклеарные клетки
МРТ	Магнитно-резонансная томография
НСК	Нейральные стволовые клетки
ОК	Опухолевые клетки
ОСК	Опухолевые стволовые клетки
ПМП	Пронейрально-мезенхимальный переход
СК	Стволовые клетки
ФБС	Фибробласты
ХТ	Химиотерапия
цАМФ	Циклический аденозинмонофосфат
ЦНС	Центральная нервная система
ЦРТ	Циторегуляторная терапия
ЭФ	Эффекторная функция

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла)
EGF	Epidermal growth factor (Эпидермальный фактор роста)
FBS	Fetal bovine serum (Эмбриональная телячья сыворотка)
FGF β	Fibroblast growth factor (Фактор роста фибробластов)
HGF	Hepatocyte growth factor (Фактор роста гепатоцитов)
HMGP1	high-mobility group protein B1 (Амфотерин)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Белок-хемоаттрактант моноцитов)
NAD	Никотинамидадениндинуклеотид
PBS	Phosphate buffered saline (забуференный фосфатом физиологический раствор, ЗФР)
PDGF	Platelet- Derived Growth Factor (Тромбоцитарный ростовой фактор)
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor 1 α (Фактор стромальных клеток)
TGF- β	Трансформирующий фактор роста- β
GFAP	Глиальный фибриллярный кислый белок