

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины»

На правах рукописи

ЧЕРНОВ

Александр Николаевич

**ЭФФЕКТЫ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ И ПЕПТИДОВ ВРОЖДЕННОГО
ИММУНИТЕТА, А ТАКЖЕ ИХ КОМБИНАЦИЙ
С ХИМИОПРЕПАРАТАМИ, НА КЛЕТКИ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА *IN VITRO***

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент,
член-корреспондент РАН

Шамова Ольга Валерьевна

Санкт-Петербург

2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. Стратегии повышения эффективности химиотерапии интракраниальных опухолей.....	17
1.2. Причины резистентности клеток интракраниальных опухолей к химиопрепаратам.....	21
1.3. Применение опухолевых и нормальных клеток мозга в качестве моделей для тестирования противоопухолевой активности веществ	23
1.4. Структурные особенности фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37, их локализация и эффекты на нормальные и опухолевые клетки человека	31
1.4.1. Структурные особенности фактора роста нервов, его локализация и эффекты на нормальные и опухолевые клетки.....	31
1.4.2. Структурные особенности кателицидина LL-37, протегрина-1, их локализация и эффекты на нормальные клетки	33
1.5. Механизмы действия химиопрепаратов, фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на клетки интракраниальных опухолей.....	35
1.5.1. Механизмы действия кателицидина LL-37 и протегрина-1 на опухолевые клетки ..	35
1.5.2. Рецепторы фактора роста нервов TrkA, p75 и пути их сигнальной трансдукции.....	39
1.5.3. Онкогены <i>MYC</i> , <i>MUCN</i> и их роль в клетках интракраниальных опухолей.....	41
1.5.4. Клеточные эффекты интерлейкина-6.....	43
1.6. Потенциальные возможности клинического применения фактора роста нервов и кателицидина LL-37 в качестве лекарственных препаратов.....	44
1.6.1. Потенциальные возможности клинического применения фактора роста нервов.....	44
1.6.2. Потенциальные возможности клинического применения кателицидина LL-37.....	47
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1. Объекты исследования	51
2.2. Группы исследования.....	52
2.3. Дизайн исследования	52
2.4. Метод культивирования клеток	57
2.4.1. Культивирование клеток глиом C6 и U251.....	57
2.4.2. Культивирование клеток интракраниальных опухолей и нормальной нейроглиальной ткани человека.....	57
2.5. Подбор концентраций реагентов и их комбинаций	59
2.5.1. Подбор доз химиопрепаратов при обособленном действии.....	59
2.5.2. Подбор концентраций фактора роста нервов и химиопрепаратов при комбинированном действии.....	61

2.5.3. Подбор доз фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на клетках глиом C6 и U251.....	62
2.6. Оценка цитотоксического действия химиопрепаратов, фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на опухолевых и нормальных клетках мозга.....	64
2.6.1. Оценка цитотоксической активности соединений с использованием красителя трипанового синего в камере Горяева.....	64
2.6.2. Оценка цитотоксического действия соединений и их комбинаций с помощью МТТ-теста	66
2.6.3. Оценка по ИК ₅₀ цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37 с химиопрепаратами и их эффектов в отношении клеток глиом C6 и U251.....	67
2.7. Определение индивидуальной чувствительности клеток интракраниальных опухолей пациентов к химиопрепаратам и фактору роста нервов.....	68
2.8. Оценка уровня секреции интерлейкина-6 методом иммуноферментного анализа	71
2.9. Электронно-микроскопическое исследование ультраструктурных особенностей типов гибели клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы	72
2.10. Оценка жизнеспособности клеток глиомы U251 с помощью ДНК-связывающих красителей YO-PRO-1 и пропидий йодида методом проточной цитометрии.....	74
2.11. Спектрофотометрический метод определения активности каспазы 3	76
2.12. Иммунофлуоресцентное определение экспрессии TrkA, p75 рецепторов и их соотношения на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы.....	77
2.13. Идентификация численности копий MYC и MYCN- онкогенов в интерфазных клетках медуллобластомы с помощью флуоресцентной <i>in situ</i> гибридизации.....	78
2.14. Статистическая обработка данных	80
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	81
3.1. Определение цитотоксической активности фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на клетках интракраниальных опухолей.....	81
3.1.1. Оценка цитотоксической активности фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на клетках глиомы C6 крысы.....	81
3.1.2. Оценка цитотоксической активности фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на клетках глиомы U251 человека	82
3.1.3. Оценка цитотоксического действия фактора роста нервов и химиопрепаратов на клетках пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека	83

3.1.4. Оценка индивидуальной чувствительности клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека к химиопрепаратам и фактору роста нервов.....	85
3.2. Определение цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетках интракраниальных опухолей.....	91
3.2.1. Оценка цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетках глиомы C6	91
3.2.2. Оценка цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетках глиомы U251	92
3.2.3. Комбинированное действие фактора роста нервов и химиопрепаратов на клетки пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека	95
3.3. Определение действия фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга человека.....	97
3.4. Изучение типов гибели клеток интракраниальных опухолей при действии фактора роста нервов, протегрина-1 и их комбинаций с химиопрепаратами.....	99
3.4.1. Изучение типов гибели клеток глиомы U251 при действии протегрина-1, этопозида и их комбинации.....	99
3.4.2. Изучение типов гибели клеток пилоцитарной астроцитомы при действии цисплатина, темозоломида, фактора роста нервов и их комбинаций	100
3.4.3. Изучение типов гибели клеток медуллобластомы при действии цисплатина, темозоломида, фактора роста нервов и их комбинаций.....	109
3.5. Потенциальные маркеры чувствительности клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека к фактору роста нервов и химиопрепаратам.....	117
3.5.1. Корреляционные зависимости между химиочувствительностью, степенью злокачественности клеток пилоцитарной астроцитомы, эпендимомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы и уровнем интерлейкина-6.....	117
3.5.2. Изменение экспрессии TrkA, p75 рецепторов, их соотношения на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы при действии фактора роста нервов и его комбинаций с цисплатином и темозоломидом.....	121
3.5.3. Влияние фактора роста нервов на количество копий <i>MYCC</i> -, <i>MYCN</i> -онкогенов в клетках медуллобластомы	128
4. ОБСУЖДЕНИЕ	132

4.1. Эффекты и механизмы действия фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37 и химиопрепаратов на клетки глиомы С6 и глиобластомы человека ..	132
4.2. Эффекты фактора роста нервов на клетках интракраниальных опухолей.....	138
4.3. Комбинированное действие ростовых факторов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетки интракраниальных опухолей.....	140
4.4. Жизнеспособность клеток нормальной нейроглиальной ткани аутопсийных образцов мозга человека ...	141
4.5. Анализ типов гибели клеток интракраниальных опухолей при действии фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами	143
4.6. Потенциальные маркеры чувствительности, резистентности интракраниальных опухолей к фактору роста нервов и химиопрепаратам.....	144
4.6.1. Применение интерлейкина-6 в качестве прогностического маркера злокачественности и химиочувствительности интракраниальных опухолей	144
4.6.2. TrkA, p75 рецепторы их соотношение как маркеры интракраниальных опухолей к действию фактора роста нервов и его комбинаций с цисплатином и темозоломидом	147
4.6.3. <i>MYCC</i> , <i>MYCN</i> -онкогены как маркеры интракраниальных опухолей к действию фактора роста нервов	148
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	150
ВЫВОДЫ.....	152
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	153
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	155
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	157
ПРИЛОЖЕНИЕ1 Группы исследования и клинические данные пациентов	193

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Онкологические заболевания представляют серьезную социально-экономическую проблему [1]. По материалам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международного агентства по изучению рака – Globocan в мире в 2020 г. зарегистрировано 19292789 новых случаев заболеваний раком, из которых 9958133 случаев закончились летальным исходом (51,6%) [2]. По прогнозам ВОЗ к 2040 г. заболеваемость и смертность от рака увеличатся на 70% и составят соответственно 29,5 и 16,4 млн. случаев [2]. У детей и подростков интракраниальные опухоли по распространенности занимают второе место, уступая только лейкозам [3]. Опухоли мозга являются гетерогенной группой, включающей как высокозлокачественные, так и низкозлокачественные гистологические типы. К наиболее частым злокачественным интракраниальным опухолям у детей относятся: медуллобластома (МБ) и нейробластома, к доброкачественным – пилоцитарная астроцитома (ПА) и эпендимома [4]. Частота распространения МБ в мире у пациентов младше 15-летнего возраста составляет 25% от всех опухолей ЦНС [4]. На долю глиом приходится 70% из 22000 новых случаев первичных опухолей мозга, выявляемых ежегодно у взрослого населения США, из которых 40% составляют злокачественные формы: глиобластомы (ГБ) и анапластические астроцитомы (АА) [5]. Показатель 5-летней выживаемости пациентов с ГБ составляет менее 5% [6]. Средняя продолжительность жизни этих пациентов при консервативном лечении – 14 недель, при хирургической резекции, сочетаемой с радиотерапией – 36, при дополнении химиотерапией – 40–50 недель [7].

Вследствие существующей опасности повреждения жизненно важных центров или диффузного характера роста интракраниальных опухолей, их оперативное вмешательство не всегда возможно, что делает актуальным совершенствование методов лучевой и химиотерапии. На сегодняшний день наиболее эффективными для лечения интракраниальных опухолей у детей и взрослых используются следующие химиопрепараты: темозоломид (TMZ), цисплатин (CSP), карбоплатин, этопозид, метотрексат, цитарабин, винкристин, циклофосфамид и доксорубин [8, 9, 10, 11, 12]. Однако, применение химиотерапии сопровождается рядом проблем: 1) слабая проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для химиопрепаратов [13]; 2) их высокая цитотоксичность, приводящая к неблагоприятным побочным реакциям со стороны физиологических систем, нередко вынуждающим прекратить химиотерапию; 3) неселективное действие химиопрепаратов, в результате которого гибнут не только опухолевые, но и нормальные высокопролиферирующие клетки (эпителиоциты и клетки красного костного мозга), что приводит к существенному ухудшению состояния здоровья пациентов; 4)

множественная лекарственная устойчивость опухолевых и стволовых клеток злокачественных опухолей, что часто приводит к их метастазам и рецидивам у пролеченных пациентов [14, 15]; 5) отсутствие унифицированных схем применения химиопрепаратов с учетом характера преимущественного морфологического состава обычно гетерогенных неоплазий, степени их злокачественности и индивидуальной чувствительности к ним опухолевых клеток и возрастного ценза пациентов [5, 16]; 6) недостаточная изученность механизмов действия новых химиопрепаратов и их клиренса [17].

В связи с этим возникает острая необходимость в новых соединениях, проявляющих селективную противоопухолевую активность на опухолевые клетки, но не вызывающих развития МЛУ и не повреждающих нормальные (здоровые) ткани организма [18, 19]. Для внедрения в клиническую практику нового лекарственного средства необходимо проведение доклинических и клинических испытаний, результатом которых является безопасность, качество и эффективность применения лекарственных субстанций [18, 20]. Начальный этап указанных исследований включает скрининг лекарственных веществ, обладающих противоопухолевой активностью с использованием моделей *in vitro*, в качестве которых в биологии, фармакологии и медицине используют клетки человека и животных [18, 20]. Скрининг лекарственных средств *in vitro* позволяет выявить «кандидаты» – вещества, предназначенные для дальнейшего тестирования *in vivo*, сократить объем и сроки последующих исследований [20]. Это в итоге способствует получению статистически значимых данных о биологической активности большого количества соединений и снижению финансовых затрат. Применение моделей *in vitro* также актуально и с точки зрения гуманного обращения с животными. Кроме того, использование методов *in vitro* дает возможность изучить молекулярные механизмы действия противоопухолевых веществ [18, 19]. В качестве таких «кандидатов» в онкологии могут рассматриваться эндогенные регуляторные белки – ростовые факторы и катионные антимикробные пептиды (АМП) системы врожденного иммунитета человека или их комбинации с химиопрепаратами.

Степень разработанности темы. К настоящему времени описано более 160 ростовых факторов [21]. Из них фактор роста нервов (NGF) входящий в семейство нейротрофинов, представляет наибольший интерес для терапии заболеваний нервной системы. NGF связывается с двумя рецепторами: p75 и TrkA [22]. Рецептор p75 (NGFR) является низкоаффинным рецептором для всех нейтрофинов (NGF, BDNF, NT3, NT4). Нейротрофная рецепторная тирозинкиназа 1 (NTRK1 или TrkA) представляет собой высокоаффинный рецептор NGF [23, 24, 25, 26]. Взаимодействие NGF с рецептором TrkA способствует выживаемости, поддержанию и дифференцировке симпатических холинэргических нейронов и глиальных клеток [22]. В то же время NGF, связываясь с рецептором p75, индуцирует апоптоз клеток [26,

27]. Установлены и противоопухолевые эффекты NGF в отношении некоторых типов опухолей. Например, к таким эффектам относятся ингибирование NGF ангиогенеза и инвазии нейробластомы [28]. Интересно, что экспрессия TrkA рецептора на клетках нейробластомы служит благоприятным прогностическим маркером исхода заболевания и предпосылкой к ее спонтанной регрессии [29, 30, 31]. Изменение же TrkA/p75 рецепторов на клетках феохромоцитомы PC12 предопределяет их чувствительность к доксорубину и CSP [32, 33]. Между тем, не изученным остается характер действия NGF, его комбинаций с химиопрепаратами, а также взаимосвязь этих эффектов с экспрессией TrkA, p75 рецепторов и их соотношением на клетках интракраниальных опухолей у детей. Также в литературе нет сведений о типах гибели клеток интракраниальных опухолей при действии комбинаций NGF с химиопрепаратами.

На сегодняшний день известно более 5000 АМП [34]. Большинство АМП – это молекулы, состоящие из 12–50 аминокислот с высоким содержанием аргинина и/или лизина. Хотя первоначально пептиды были названы антимикробными, как соединения, обладающие антибиотической активностью в отношении бактерий, одноклеточных грибов, простейших и вирусов, как оказалось, многие АМП обладают иммуномодулирующим, ранозаживляющим действием, в то время как некоторые пептиды – проявляют выраженную цитотоксическую активность против неопластических клеток, резистентных к применяемым в медицине химиопрепаратам [35, 36, 37]. Пептиды имеют различные структуры, наличие и выраженность того или иного эффекта зависит от структурных особенностей каждого пептида. Для изучения механизмов противоопухолевого действия автором были выбраны два пептида с различной структурой из семейства кателицидинов: кателицидин LL-37 с α -спиральной структурой из азурофильных гранул нейтрофилов человека и протегрин-1 (PG-1) – пептид с конформацией β -шпильки из нейтрофилов свиньи. В высоких концентрациях, эти пептиды являются токсичными для клеток человека [31, 38], что создает препятствие для их внедрения в медицинскую практику. Одним из путей решения этой проблемы может быть поиск путей снижения эффективной концентрации LL-37 и PG-1. Снижение эффективной концентрации, в свою очередь, может быть достигнуто комбинированным применением LL-37 и PG-1 с веществами, обладающими синергичным действием с данными кателицидинами. В частности, актуальным является поиск комбинаций АМП с ростовыми факторами или химиопрепаратами, обладающих цитотоксической активностью против клеток опухолей головного мозга.

Экспрессия онкогенов *MYC* семейства (*MYCC*, *MYCN*) ассоциирована с активацией пролиферации, репликации ДНК, трансформации клеток МБ и нейробластомы [39, 40]. Установлено, что экспрессия *MYCC*-онкогена изменяет чувствительность перевиваемых клонов D341, D425 МБ к химиопрепаратам [39]. В научной литературе нет сведений о действии NGF

на численность копий *MYCC*, *MYCN*-онкогенов в клетках МБ. Проведение такого исследования позволит использовать NGF для повышения чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам.

Для повышения эффективности химиотерапии перспективными являются исследования, направленные на выявление потенциальных диагностических и прогностических маркеров интракраниальных опухолей. В качестве таких возможных маркеров могут рассматриваться интерлейкины семейства цитокинов, обладающие провоспалительными эффектами. Известно, что уровень секреции интерлейкина-6 (IL-6) клетками множественной лейкемии, почечной аденокарциномы, рака предстательной, молочной желез, желудка, легкого связан с агрессивностью заболеваний и развитием устойчивости их клеток к химиопрепаратам [41, 42]. Проведение исследования на клетках интракраниальных опухолей позволит установить роль IL-6 в качестве потенциального маркера их злокачественности и резистентности к химиопрепаратам.

Исследования, приведенные в настоящей работе, актуальны, поскольку углубление представлений о механизмах действия NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами на клетки опухолей мозга позволит выявить новые возможности коррекции патологических процессов, и в перспективе снизить негативное цитотоксическое действие химиопрепаратов на здоровые клетки организма человека, а также создать новые схемы лечения онкологических заболеваний.

Таким образом, **целью работы** являлось изучение молекулярно-клеточных механизмов обособленного и комбинированного действия фактора роста нервов, пептидов семейства кателицидинов (LL-37, PG-1) и химиопрепаратов на клетки опухолей головного мозга (глиомы C6, U251, пилоцитарная астроцитома, анапластическая астроцитома, глиобластома и медуллобластома) при применении индивидуальных фракций этих соединений и их комбинаций с различными химиопрепаратами *in vitro*.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить цитотоксическую активность NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами в отношении клеток глиом C6, U251, пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека *in vitro*.
2. Охарактеризовать *in vitro* действие NGF и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки здоровой нейроглиальной ткани мозга человека.
3. Изучить типы гибели клеток глиомы U251, пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы при *in vitro* действии NGF, PG-1, LL-37, цисплатина, темозоломида, этопозида и их комбинаций.

4. Провести анализ, направленный на выявление корреляционных связей чувствительности, степени злокачественности клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, эпендимомы, глиобластомы и медуллобластомы с уровнем секреции IL-6 в среде при действии *in vitro* химиопрепаратов и NGF.
5. Исследовать экспрессию рецепторов TrkA, p75 и их соотношение на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы, установить их взаимосвязь с чувствительностью клеток опухолей к NGF, его комбинациям с цисплатином или темозоломидом.
6. Оценить изменение количества копий онкогенов (*MYCC*, *MYCN*) в клетках медуллобластомы при *in vitro* действии NGF.

Научная новизна. Впервые установлено, что NGF, LL-37 и PG-1 проявляют высокую цитотоксичность по отношению к культивируемым клеткам глиом C6, U251, а также NGF обладает высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам ПА, АА, ГБ и МБ человека, в большинстве случаев, превышающую цитотоксическую активность исследованных химиопрепаратов.

Впервые констатировано, что комбинации NGF с химиопрепаратами проявляют цитотоксическое действие на клетки ПА, АА, ГБ и МБ. Впервые показано, что комбинации PG-1 с карбоплатином или доксорубицином, а также LL-37 с этопозидом оказывают синергетические цитотоксические эффекты на клетки глиомы C6. Комбинация PG-1 с этопозидом обладает синергетическим цитотоксическим действием на клетки глиомы U251 человека. Впервые установлено, что при комбинированном действии NGF с цисплатином или темозоломидом на клетки ПА и МБ наблюдается смена типов их гибели в сторону более разрушительных (некроз, смешанный тип) по сравнению с индивидуальным применением указанных химиопрепаратов и NGF, вызывающих апоптоз. При синергичном цитотоксическом действии комбинации PG-1 с этопозидом по сравнению с действием этопозидом наблюдается увеличение доли клеток глиомы U251, погибших по типам апоптоза и некроза.

Впервые показано, что добавление NGF к химиопрепаратам снижает их цитотоксический эффект на клетки здоровой нейроглиальной ткани мозга человека.

Впервые показано, что уровень секреции IL-6 клетками ПА, эпендимомы, АА, ГБ и МБ коррелирует со степенью злокачественности опухолей. Установлена взаимосвязь между уровнем IL-6 и чувствительностью клеток высокозлокачественных (АА, ГБ, МБ) опухолей к химиопрепаратам и NGF.

Впервые продемонстрировано, что чувствительность клеток АА и ГБ к комбинациям NGF с цисплатином или темозоломидом предопределяется соотносительной экспрессией рецепторов

TrkA/p75, что позволяет рассматривать данный показатель в качестве маркера ответа клеток АА, ГБ на действие комбинаций NGF с цисплатином или темозоломидом.

Впервые показано, что в результате действия NGF наблюдается уменьшение численности клеток МБ, содержащих аномально повышенное количество копий *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов и повышение количества опухолевых клеток, содержащих диплоидный набор копий генов *MYCC* и *MYCN*, что позволяет рассматривать число копий *MYCC*-онкогена в геноме в качестве маркера резистентности МБ к NGF и химиотерапии.

Теоретическая и практическая значимость работы. На опухолевых клетках исследованы эффекты соединений, относящихся к совершенно разным группам биологически активных молекул – NGF, относящегося к семейству нейротрофинов и пептидов, проявляющих антимикробные свойства. Установлено, что кроме известных видов активности эти соединения не только могут вызывать гибель опухолевых клеток, но и усиливать противоопухолевые свойства друг друга, а также и действия целого спектра химиопрепаратов. Получены новые данные, расширяющие представления о роли NGF и пептидов врожденного иммунитета в противоопухолевой защите. Установлены пути клеточной гибели при воздействии NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций с химиотерапевтическими препаратами на клетки С6, U251, ПА, АА, ГБ и МБ человека, а также ряд факторов (IL-6, TrkA/p75), являющихся маркерами эффективности противоопухолевого действия изученных веществ и их комбинаций. Результаты, показывающие прямое цитотоксическое действие NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций с химиопрепаратами на клетки С6, U251, ПА, АА, ГБ и МБ человека, являются первым этапом скрининга NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций в качестве кандидатов для доклинических испытаний, в частности, позволяют спланировать дальнейшие исследования по изучению введения NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций с химиопрепаратами животным с перевиваемыми опухолями.

Полученные результаты показывают, что максимальный цитотоксический эффект на клетки пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы человека оказывает комбинация NGF с этопозидом, на клетки анапластической астроцитомы – комбинация NGF с цисплатином и на клетки глиобластомы – комбинация NGF с карбоплатином. Что может являться основой для создания новых схем лечения данных опухолей у животных и человека. Также полученные результаты показывают, что при химиотерапии опухолей можно вводить NGF в качестве хемопротектора.

Методология и методы исследования. Работа выполнена на клетках интракраниальных опухолей, взятых у 98 пациентов в возрасте от 3 мес до 17 лет ($8,3 \pm 0,6$ года), находившихся на лечении в Городской клинической больнице скорой медицинской помощи г. Минска. В исследование также включены 10 скоропостижно умерших человек ($57,1 \pm 4,0$ лет), у которых во

время вскрытия в морге Управления судебно-медицинских экспертиз Государственного комитета судебно-медицинских экспертиз Республики Беларусь по Минской области была взята нормальная нейроглиальная ткань мозга. С целью формирования клинически относительно однородных групп пациентов из историй болезней получали сведения о гистологическом типе, степени злокачественности, локализации опухоли в отделах головного мозга, радикальности хирургического вмешательства у пациентов. Сведения позволили сформировать 5 исследуемых групп. В первую группу вошли 42 пациента с ПА (GrI, 22 мальчика и 20 девочек, $7,9 \pm 0,7$ года). Вторая группа включала 9 пациентов с АА (GrIII, 5 мальчиков и 4 девочки, $8,6 \pm 1,6$ года). Третья группа включала 9 пациентов с ГБ (GrIV, 9 мальчиков, $10,3 \pm 1,9$ года). Четвертая группа состояла из 38 детей с МБ (GrIV, 27 мальчиков и 11 девочек, $5,7 \pm 0,6$ года). В пятую группу вошли 10 скоропостижно умерших человек, у которых во время вскрытия были взяты фрагменты мозга (8 мужчин и 2 женщины, $57,1 \pm 4,0$ лет). Отдельную группу составили линии клеток глиомы С6 и U251, на которых проводили подбор концентраций химиопрепаратов, NGF, PG-1, LL-37, их комбинаций, а также определяли их цитотоксическую активность по расчету 50%-ной ингибирующей концентрации (ИК₅₀) и эффекты комбинаций.

Клетки глиомы крысы С6 и U251, интракраниальных опухолей и нейроглиальной ткани мозга человека культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) при стандартных условиях. Опухолевые клетки культивировали в течение 1-2 сут, клетки нейроглиальной ткани – в течение 28 сут. Оценку односуточного цитотоксического действия химиопрепаратов, NGF, PG-1, LL-37, их комбинаций на опухолевых и клетках нейроглиальной ткани проводили, подсчитывая погибшие клетки в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. Цитотоксичность химиопрепаратов, NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций на клетках глиомы С6, U251 также оценивали в 4-6 концентрациях с помощью МТТ-теста. Цитотоксическое действие в этом случае сравнивали по значениям ИК₅₀. С помощью показателя ИК₅₀, определяли комбинационный индекс (КИ, CI) и типы эффектов комбинаций (синергизм, антагонизм, аддитивность). При применении PG-1, этопозида и их комбинации оценивали гибель клеток глиомы U251 по типу апоптоза или некроза методом проточной цитометрии с использованием окраски суспензии флуоресцентными ДНК-связывающими красителями YO-PRO-1 и йодидом пропидия (PI). Также оценивали активность каспазы-3 колориметрическим методом по скорости расщепления хромогенного субстрата Ac-DEVD-pNA, используя набор «Caspase3 Assay Kit, Colorimetric» (Sigma, США). При действии химиопрепаратов, NGF и их комбинаций наблюдали морфологические изменения в клетках ПА и МБ с помощью электронного микроскопа JEM-100CX (JEOL Ltd., Япония) при увеличениях $\times 4800$ – 14400 .

Оценку уровня секреции IL-6 клетками ПА, АА, ГБ, МБ и эндимомы, проводили методом иммуноферментного анализа с помощью тест-набора для определения IL-6 человека (BD Biosciences, США).

При применении цисплатина, темозоломида, NGF и их комбинаций изучали экспрессию TrkA, p75 рецепторов, их соотношение TrkA/p75 на клетках АА, ГБ и МБ с помощью первичных Anti-TrkA, Anti-p75 (Pan-NGFR) и вторичных кроличьих FITC-конъюгированных Anti-Rabbit Ig-FITC антител методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Определяли соотношение TrkA/p75 и корреляции между экспрессией TrkA, p75-рецепторов, TrkA/p75 и индексом цитотоксичности (ИЦ) исследуемых соединений.

Аmplификацию (число копий) онкогенов MYCC и MYCN в интерфазных клетках МБ пациентов выявляли методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с помощью ДНК зондов VysisLSI MYCC (8q24.12-q24.13), VysisLSI MYCN (2p24), меченных флуорохромом SpectrumOrange. Оценивали корреляции между числом копий онкогенов и ИЦ NGF.

Статистический анализ выполняли с помощью программного пакета Statistica (версия 6.0). Результаты представляли в виде средней арифметической (M) и стандартного отклонения (SD). Для сравнения двух групп по выраженности количественных признаков применяли однофакторный (ANOVA one-way), двухфакторный (ANOVA two-way) дисперсионный анализ и F-критерий (Фишера). В случае отклонения нормальности в независимых выборках и наличия малого количества образцов ($n < 30$) для их сравнения использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Положения диссертации, выносимые на защиту.

1 NGF, кателицидин LL-37 человека и протегрин-1 свиньи проявляют выраженную цитотоксическую активность, превосходящую активность химиопрепаратов, в отношении клеток глиом C6 и U251 *in vitro*. Цитотоксическая активность NGF сопоставима с действием химиопрепаратов на клетки пилоцитарной астроцитомы и анапластической астроцитомы и превышает по эффективности действие химиопрепаратов на клетки глиобластомы и медуллобластомы *in vitro*.

2. Для комбинаций PG-1 с карбоплатином, доксорубицином, цисплатином, этопозидом и LL-37 с этопозидом выявлен синергизм их цитотоксического *in vitro* действия на клетки глиом C6 и U251. Комбинированное действие NGF с химиопрепаратами проявляет активность, сопоставимую с действием NGF в отношении клеток пилоцитарной астроцитомы и анапластической астроцитомы, тогда как действие комбинаций было менее выражено по сравнению с действием NGF на клетках глиобластомы и более выражено по сравнению с действием NGF на клетках медуллобластомы *in vitro*.

3. Применение *in vitro* NGF оказывает действие, защищающее клетки здоровой нейроглиальной ткани мозга человека от повреждающего действия химиопрепаратов. При добавлении NGF к химиопрепаратам в семи из восьми комбинаций наблюдается действие, снижающее цитотоксический эффект химиопрепаратов в отношении нормальных клеток нейроглиальной ткани мозга человека.

4. Комбинация этопозида и PG-1 оказывает *in vitro* синергическое цитотоксическое действие на клетки глиомы U251, выражающееся в увеличении доли клеток, гибнущих по апоптотическому пути и в результате некроза, по сравнению с индивидуальным воздействием PG-1 и этопозида. При действии этопозида повышается активность каспазы-3 в клетках U251 глиомы, подтверждая их гибель по пути апоптоза. В результате комбинирования NGF с цисплатином или темозоломидом наблюдается гибель клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы по смешанному типу или по пути некроза, в отличие от их гибели по пути апоптоза при индивидуальном применении указанных химиопрепаратов и NGF.

5. При культивировании клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, эпендимомы, глиобластомы и медуллобластомы *in vitro* в течение 24 ч, концентрация IL-6 в культуральной среде положительно коррелирует со степенью злокачественности клеток, а также отрицательно коррелирует с чувствительностью клеток анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы к NGF и химиопрепаратам.

6. Соотносительная экспрессия TrkA/p75 рецепторов на клетках анапластической астроцитомы и глиобластомы положительно коррелирует с их чувствительностью к NGF и его комбинации с темозоломидом и отрицательно коррелирует с чувствительностью клеток глиобластомы к комбинации NGF с цисплатином.

7. В результате *in vitro* действия NGF на клетки медуллобластомы наблюдается увеличение доли клеток с диплоидным набором копий онкогенов *MYCN* и *MYCC* и снижение доли клеток с аномально повышенным количеством копий онкогенов, обладающих пониженной чувствительностью к NGF.

Личный вклад соискателя ученой степени. Личный вклад автора работы заключался в проведении экспериментов, анализе клинической информации и литературных сведений, статистической обработке и интерпретации, обобщении полученных данных и научной редакции рукописи. Исключение составил FISH анализ, выполненный для оценки численности копий *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов в МБ (выполнен на базе лаборатории цитогенетики РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь, г. Минск). Диссертантом осуществлялось также написание статей и тезисов, либо принималось активное участие в подготовке соответствующих материалов.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности полученных в работе данных определяется достаточным и репрезентативным количеством экспериментального материала (n=98 пациентов с интракраниальными опухолями, 10 лиц у которых была взята нейроглиальная ткань, 10389 посевов, 1020 аликвот и 417 электроннограмм), применением адекватных методов исследования, в том числе методов статистического анализа.

Информация о внедрении результатов исследования. Результаты работы защищены патентами Республики Беларусь № 15518 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения медуллобластомы у ребенка», № 15520 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения астроцитомы у ребенка», № 1563327 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения глиальной опухоли центральной нервной системы», № 16006 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или их комбинации для оптимизации лечения эпендимомы у ребенка», № 17256 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения атипичной тератоидной / рабдоидной опухоли человека», № 17752 «Способ определения чувствительности клеток нейробластомы человека к химиопрепарату или их комбинации химиопрепаратов». Результаты работы, в частности, «Способ оценки индивидуальной чувствительности клеток нейроэпителиальных опухолей человека к химиопрепаратам» внедрены в клиническую практику онкогематологического отделения для детей старшего возраста Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь и в курс лекций кафедр детской онкологии и гематологии Белорусской медицинской академии последипломного образования и экологической и медицинской генетики по дисциплинам «стволовая клетка» и «цитология и гистология» Международного государственного экологического университета им. А. Д. Сахарова, а также кафедры биотехнологии по дисциплинам «молекулярная биология клетки» и «генотерапия» Полесского государственного университета. Проведение стратификации пациентов с медуллобластомой по группам риска, определяющим интенсивность и продолжительность химиотерапии на основе амплификации MYCC, MYCN-онкогенов FISH анализом внедрено в клиническую практику Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Информация о публикациях. По теме работы опубликовано 30 печатных работ: из них 12 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. В том числе 3 статьи - в

международных научных журналах на английском языке, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, 1 статья в журналах, индексируемых в базе данных Scopus. Также опубликованы: одна глава в коллективной монографии на английском языке, 2 статьи в сборниках конференций, 9 тезисов докладов и 6 патентов на изобретения Республики Беларусь.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Стратегии повышения эффективности химиотерапии интракраниальных опухолей

Комбинированное лечение онкологических заболеваний, в том числе интракраниальных опухолей у детей, включающее операционное вмешательство, сочетаемое с радио- и химиотерапией, на сегодняшний день не достигло желаемой эффективности. Пятилетняя выживаемость пациентов с МБ составляет 45–54%, примитивной нейроэктодермальной опухолью – 32% и ГБ – менее 10% [4, 43, 44]. Ряд труднопреодолимых причин лежит в основе низкой излечиваемости интракраниальных опухолей. Эффективность их хирургической резекции не превышает 50–60% и ограничивается локализацией опухолей вблизи жизненно важных центров, диффузно-инфильтративным ростом, большими размерами, наличием метастазов в спинной мозг, кости, висцеральные органы и лимфатические узлы [45, 46]. К другим факторам риска, связанным с неблагоприятным течением патологии, относятся: возраст детей менее трех лет, объём остаточной опухоли более 1,5 см³, анатомо-топографическое расположение, степень злокачественности по Chang (GIII–IV) [47, 48].

Невысокая эффективность химиотерапии опухолей мозга объясняется: 1) слабой проницаемостью ГЭБ для химиопрепаратов [49, 50], зависящей от молекулярного веса химиопрепарата и водооктанового коэффициента [51]; 2) низкой сосредоточенностью химиопрепаратов в клетках опухоли [9]; 3) первичной нечувствительностью опухолевых клеток к химиопрепаратам на фоне их применения в течение последующих курсов вплоть до развития множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) [52]. Последняя наблюдается в клетках опухолей ЦНС с высокой степенью злокачественности, опухолевых стволовых клетках [53] и в опухолях с низкой дифференцировкой [54]; 4) мутагенным действием многих химиопрепаратов, которое способствует развитию регионарных метастазов и рецидивам первичной опухоли, поликлональной прогрессии и повышению агрессивности заболевания, в отношении которого проводится курс лечения [52]; 5) морфологической и генетической гетерогенностью клеточного состава опухолей ЦНС [47, 55]; 6) степенью сосудодообразования, регионарным кровотоком и проницаемостью капилляров опухоли [51]; 7) недостаточной изученностью механизмов действия новых химиопрепаратов, их клиренса, интрацеллюлярной кинетики [56]; 8) разнообразием методов инъекции и экскреции химиопрепаратов, затрудняющим реальную оценку количества молекул, действующих на опухолевые клетки [57]; 9) отсутствием унифицированных схем применения химиотерапевтических средств; 10) ограниченностью использования и спорадичностью данных по оценке индивидуальной чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам [11, 16]; 11) выраженным побочным

токсическим эффектом, сводимым к нарушению общего тканевого метаболизма, дерегуляции эндокринного аппарата, подавлению иммунитета, развитию инфекционных осложнений, что в совокупности приводит к инвалидизации и является главным фактором, сдерживающим увеличение терапевтической дозы [52, 55, 58]; 12) ограниченностью спектра отечественных химиопрепаратов, которая ставит иногда клиницистов в зависимость от поставок зарубежных аналогов.

Указанные выше проблемы определяют большую численность и вариабельность: 1) протоколов химиотерапии: HIT91, CCG-921, SIOP/GPO9MED [59], CNS high grade 3-4 [45], HIT-2000 [46], HIT-GBM-D [8], VETOPEC-I, -II [9], BABY BRAIN91, HEAD START-I, -II [60], SIOP-PNET-II, “8 in 1” [61], Rhabdoid 2007, Head Start III [62]; 2) концентраций химиопрепаратов [45, 46]; 3) приемов введения: внутривенное [46, 61, 63], ликворное, интратекальное [57, 64], интравентрикулярное [61], субарахноидальное [65]; внутрикаротидное; 4) режимов химиотерапии: высокодозовая, комбинированная [43, 59], комплексная [45, 46], адьювантная [56], поддерживающая, миелобластная [60], индукционная [45, 46], постоперационная [66].

В настоящее время насчитывается более 100 различных по природе, химическому строению, механизму действия и фармакологическим свойствам химиопрепаратов, предназначенных для лечения опухолей. К ним относятся: алкилирующие ДНК агенты, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, вещества растительного происхождения, ферменты (L-аспарагиназа), гормональные средства (дексаметазон, преднизолон), модификаторы биологических реакций (цитокины, интерфероны) [52]. К химиопрепаратам, обладающим наибольшим цитотоксическим действием в отношении интракраниальных опухолей, относятся: TMZ [10], CSP, карбоплатин, винкристин, этопозид, метотрексат [67], цитарабин, циклофосфамид [45, 46, 47, 61], иринотекан [68], ломустин [69], кармустин [9] и доксорубин [12]. Большинство из этих химиопрепаратов использовано автором в исследованиях.

Предпочтение комбинированного применения химиопрепаратов перед обособленным способствует активной разработке двух генеральных направлений повышения эффективности химиотерапии. Первое сводится к улучшению проницаемости ГЭБ при системном введении химиопрепаратов. Второе предусматривает таргетную доставку химиопрепарата непосредственно в опухоль [13, 15, 49, 50, 70]. Первое направление включает несколько подходов. Один из них состоит в применении гипертонических растворов гистамина, брадикинина, маннитола, облегчающих проникновение химиопрепаратов в клетки мозга [71]. Образование фенестраций в структуре ГЭБ, создаваемых плотным контактом эндотелиоцитов и перицитов сосудов, одновременно повышает риск поступления через них нейротоксических

соединений, что особенно опасно при внутрикратидной инфузии химиопрепаратов [72]. Проницаемость ГЭБ сопряжена с присоединением к основной патологии сопутствующих заболеваний, таких как: инсульты, воспалительные процессы, нарушения речи, зрительного восприятия и прочее.

Другой подход включает синтез конъюгатов противоопухолевых соединений с белками, взаимодействующих с компонентами ГЭБ на эндотелиоцитах. Например, антителами к рецепторам смерти TNF- α (TNFR1, FAS, DR4, DR5) [73], трансферрину [74], дифтерийному токсину [13], липопротеину низкой плотности [75], рецепторам фолиевой кислоты [76], которые при связывании с лигандом, поставляемым наночастицами, переносят путем эндо- или трансцитоза сцепленный с ними доксорубин [77]. Перспективным выглядит конъюгирование химиопрепаратов с ингибиторами гликопротеина Р [13, 49, 50] или с транспортерами глюкозы GLUT1 [73]. Например, конъюгирование хлорамбуцила, мелфалана с переносчиком аминокислот (L-type amino acid transporter 1) LAT1 [74, 78]. Рациональным представляется конъюгирование прометаболитов типа цитарабина, гемцитабина и других, подавляющих *de novo* синтез и эндцитоз нуклеотидов в опухолевых клетках, с ингибиторами нуклеотидных транспортеров (hENT-1,-2), которые проявляют повышенную активность в опухолях [50]. Доклинические испытания конъюгатов гликопротеина Р с паклитакселом подтвердили целесообразность данного подхода, делая оправданным переход к испытаниям в клинической практике [79].

Предпринимаются попытки комбинирования химиопрепаратов с аналогом брадикинина RMP-7 (Cereport), который изменяет проницаемость ГЭБ [70, 80]. RMP-7, соединяясь со специализированным участком связывания карбоплатина, способствует проникновению химиопрепарата в опухоль. Вторая стадия клинических испытаний на 87 пациентах со злокачественными глиомами подтвердила преимущество такой комбинации перед индивидуальным использованием карбоплатина [70]. Разрабатывается направление, связанное с ингибированием экспрессии белков плотных контактов (клаудина-1, -5, оклудина, ZO-1 белка) микрососудов астроцитомы посредством факторов роста гепатоцитов и эндотелия сосудов (VEGF), что обеспечивает проникновение конъюгированных с ними химиопрепаратов [72, 81].

Возникает проблема доставки с терапевтической целью химиопрепаратов через ГЭБ к интракраниальным опухолям [81]. На сегодняшний день нет однозначного мнения о проницаемости ГЭБ для химиопрепаратов. Одни авторы [79] утверждают о его проницаемости для химиопрепаратов, ссылаясь на деструкцию барьера при опухолевом процессе [49], другие – констатируют его проницаемость только соединениями с молекулярной массой менее 700 дальтон [78]. В связи с указанным обстоятельством, предпринимаются попытки таргетной доставки химиопрепаратов к клеткам интракраниальных опухолей посредством заключения их в липосомы [82, 83], дендримеры [84], фуллерены [85], хитозановые наночастицы [86, 87, 88],

мицеллы [89] или, соединяя с парамагнитными наночастицами оксида железа [90, 91], что позволяет повысить концентрацию активных веществ непосредственно в опухоли.

Иной методический прием, связанный с повышением концентрации этопозида, заключается во введении его через резервуар типа осмотической помпы Амауата, встроенный в мозг пациента, что приводит к стократному повышению концентрации препарата в опухоли [92].

Нередко рост злокачественных опухолей сопровождается персистенцией или латенцией вирусной инфекции. В этих случаях оправдано комбинированное использование химиопрепаратов с вирусотерапией, что повышает эффективность лечения онкологических пациентов [93, 94]. Генная таргетная терапия привлекательна отсутствием системной токсичности и возможностью микроинъекций трансфектированных клеток через стереотаксические процедуры или краниотомию для направленного цитолиза опухолевых клеток. При этом аденовирусы выглядят более предпочтительными по причине высокой стабильности и низкого уровня генетической изменчивости, а, следовательно, малого риска возникновения мутаций [93, 94]. Использование полимерных капсул, конъюгированных с вирусными векторами, обеспечивает мозг опухолевыми клетками, экспрессирующими желаемый ген, продукты которого целенаправленно действуют на звенья онкогенеза. Объектами обычно служат первичные фибробласты, астроциты, эпендимоциты и стволовые клетки. Например, из опухолевых предшественников нейробластов эмбрионов крыс с внедренными в них ДНК NGF выделен субклон CINP, освобождающий *in vitro* его в количестве 2 нг/ч на 100 000 клеток на протяжении 10 недель [95].

Повышение эффективности химиотерапии ведется на уровне организма. По-прежнему самым частым приемом введения и доставки в организм химиопрепаратов остается системное кровеносное русло. При этом их негативному действию подвергаются все системы организма, а в большей степени иммунная, что может привести к летальному исходу онкологических пациентов от сопутствующих заболеваний [96]. В целях поддержания иммунологического статуса пациентов, получавших химиотерапию, оправданным выглядит комбинированное лечение, сочетающее химио- и иммунотерапию [97]. Последняя включает ряд модификаций: цитокинотерапию (IL-2, IL-6, ронколейкин, TNF- α), гематопоэтические факторы роста); гормонотерапию и применение аутологических периферических стволовых клеток [53]. Например, использование ронколейкина в многокомпонентном методе лечения детей с МБ оказывает иммуностимулирующее действие, сохраняя субпопуляции лимфоцитов, особенно Т-хелперов, через их активацию путем экспрессии рецепторов интерлейкина-2. Это индуцирует трехкратное и более снижение частоты инфекционных осложнений в период проведения индукционной химиотерапии [96]. Кроме того, цитокины (гранулоцит-колониестимулирующий

фактор, IL-3, IL-6) поддерживают и пролонгируют жизнеспособность клеток различных типов, в том числе нервных, а уровень этих факторов отчасти определяет интенсивность апоптоза в тканях [14]. Отсутствие четких прогностических критериев эффективности химиотерапии интракраниальных опухолей делает актуальным изучение IL-6 в качестве маркера степени злокачественности и чувствительности клеток интракраниальных опухолей к химиопрепаратам.

Также клиническое подтверждение получила антиангиогенная терапия [97, 98, 99]. Сущность ее заключается в целенаправленном использовании эндогенных препаратов: ангиостатина, эндостатина, фактора, производимого пигментным эпителием (PEDF), тумстатина, активина А [97, 100] и таргетных препаратов: бевацизумаба [101, 102], сунитиниба [103], тандутиниба [104] и нимотузумаба [105], ингибирующих различные звенья ангиогенеза опухолей, препятствуя доставке к их клеткам кислорода и питательных веществ. Например, бевацизумаб – моноклональное антитело к VEGF широко применяется для лечения пациентов с ГБ [73, 101] и МБ [102]. Сунитиниб – ингибитор мишени рапамицина млекопитающих (mTOR), стимулирует апоптоз, экспрессию фосфатазы и делецированного гомолога тензина на 10 хромосоме (PTEN) [103], подавляет каскады сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции (STAT-3), протеинкиназу В (АКТ) и миграцию Даоу клеток МБ и нейробластомы [103, 106]. Присутствие TrkA рецептора NGF на клетках клона SH-SY5Y нейробластомы человека подавляет биосинтез ими VEGF и способствует синтезу ингибитора ангиогенеза (sflt1) [23].

1.2. Причины резистентности клеток интракраниальных опухолей к химиопрепаратам

Отличия в химиочувствительности клеток разных по гистологии опухолей могут объясняться активацией химиопрепаратами различных белков-мишеней в путях сигнальной трансдукции и генов. Например, CSP, карбоплатин, ковалентно связываясь с атомами азота в седьмом положении гуанина и аденина, образуют межнуклеотидные сшивки в пределах одной цепи ДНК и тем самым препятствуют ее репликации [107, 108], что коррелирует со снижением активности ДНК-полимераз- α , β и γ . Поэтому, гиперчувствительные к действию CSP клеточные линии лейкозных клеток отличаются сниженной активностью ДНК-полимераз [109]. TMZ метилирует гуанин, нарушает репликацию ДНК, синтез РНК и белка [108]. Устойчивость к химиопрепаратам коррелирует с экспрессией в опухолевых клетках фермента репарации ДНК-метилгуанин-метилтрансферазы, которая удаляет алкильные аддукты в шестой позиции гуанина до того, как происходит формирование сшивки, тем самым предотвращает цитотоксический эффект химиопрепарата [109]. В результате действия цитарабина наблюдается ингибирование активности ДНК-полимеразы- γ через встраивание метаболитов, что способствует разрыву цепей ДНК и снижению количества дезоксирибонуклеотидов. Антагонист фолиевой кислоты – метотрексат ингибирует тетрагидрофолатредуктазу,

уменьшает запасы восстановленных фолатов и нарушает образование пуриновых оснований [108]. Топотекан и этопозид ингибируют соответственно ДНК-топоизомеразы-I и II, что препятствует раскручиванию ее суперспирали [108, 110].

Активность химиопрепаратов зависит от нахождения опухолевых клеток их в различных фазах G₂, M, S цикла [111] или от потери G₂ контрольной точки в клетках лимфомы [112]. Например, метотрексат, TMZ и цитарабин подавляют жизнеспособность клеток в S-фазе, этопозид и топотекан ингибируют позднюю S и переход в G₂, а эффекты карбоплатина и CSP не зависят от фаз клеточного цикла [108].

Основное обстоятельство, предопределяющее нечувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам, связано со сверхэкспрессией в них белков МЛУ, которые в норме выполняют функцию детоксикации (например, система глутатион-S-трансферазы) [109, 113, 114]. Сверхэкспрессия ферментов метаболизма глутатиона способствует резистентности опухолевых клеток к алкилирующим агентам, в том числе к соединениям платины [109, 114]. Чрезмерный синтез этих белков в опухолевых клетках лежит в основе разрабатываемой стратегии повышения их чувствительности к химиопрепаратам путем добавления специфических ингибиторов, таких как варапамил и циклоспорин, снижающих активность Р-гликопротеина до уровня в нормальных клетках [109]. Например, установлена высокая корреляция между повышением экспрессии гена *ABCВ1* и снижением активности топоизомеразы-II (ингибитор этопозид) в опухолевой ткани. С другой стороны, цитотоксическая активность супрессоров топоизомераз II потенцируется препаратами-ингибиторами топоизомеразы-I [109, 114].

С точки зрения преодоления в клинических условиях лекарственной резистентности, существенное значение имеет отсутствие у устойчивых сублиний тотальной лекарственной резистентности ко всем используемым химиопрепаратам [109]. Повышенная экспрессия белков МЛУ в опухолевых клетках может быть использована для их селективной гибели. В частности, была предложена схема применения из двух химиопрепаратов с различными механизмами действия. Первый из них является субстратом для экспрессируемого в клетке белка указанного семейства и его концентрация подбирается таким образом, чтобы он вызывал остановку клеточного цикла нетрансформированных клеток, но не цитотоксический эффект. Клетки опухоли в силу повышенной эффективности удаления первого химиопрепарата остаются жизнеспособными и гибнут при последующем действии второго химиопрепарата, который не является субстратом для данного белка МЛУ и действует на клетки в S-фазе [115].

Кроме того, снижение чувствительности клеток к химиопрепаратам обусловлено усилением процессов репарации ДНК, увеличением количества клеток в G₀/G₁-фазах клеточного цикла, их локализацией в защищенных барьерами тканях (ЦНС, яички),

инактивацией химиопрепаратов в других органах (печень) и модулирующем действием внеклеточных медиаторов в т.ч. ростовых факторов на гибель опухолевых клеток [115].

Примерно одинаковая чувствительность клеток опухолей сразу к нескольким химиопрепаратам объясняется феноменом «перекрёстной чувствительности» препаратов с схожим механизмом действия. Например, в экспериментах на клеточных линиях острого лимфолейкоза возникновение устойчивости его клеток к ингибитору топоизомеразы-II (этопозиду) сопровождается резистентностью к другому препарату с близким механизмом действия (топотекану), но менее устойчиво к винкристину, вызывающему блокаду тубулина. Для некоторых химиопрепаратов наблюдается обратный эффект – повышение чувствительности. Например, лейкозные клеточные линии K562 и HL60, устойчивые к доксорубину и винкристину, оказываются более чувствительными к аналогам пиримидиновых оснований [109, 114].

1.3. Применение опухолевых и нормальных клеток мозга в качестве моделей для тестирования противоопухолевой активности веществ

На сегодняшний день применение опухолевых клеток с целью определения их чувствительности к химиопрепаратам еще не вошло в повседневную клиническую практику, но тенденция к тому становится все более очевидной. Она диктуется растущим пониманием необходимости перехода от групповой к индивидуальной комплексной терапии, учитывающей не только гистологический тип опухоли, стадию ее прогрессии, степень злокачественности, пол, возраст, расовую принадлежность пациентов, но и индивидуальную чувствительность неопластических клеток организма-носителя [16, 116, 117]. Причиной этого является многофакторная общая лекарственная и перекрестная резистентность опухолей, развивающаяся в ходе их роста и терапии [116, 117]. Отсюда определение химиочувствительности *in vitro* в сочетании с другими показателями (клинической картиной течения заболевания, результатами цитоморфологического, биохимического, молекулярно-генетического анализов) рассматривается как основная стратегия повышения эффективности противоопухолевой терапии [116]. Благодаря культивированию опухолевых клеток удастся: 1) количественно оценить и прогнозировать общую нечувствительность независимо от ее природы, а также цитотоксический эффект данного испытуемого препарата или комбинации нескольких препаратов (терапевтический индекс) путем оценки их влияния на выживаемость и/или пролиферативную активность опухолевых клеток;

2) провести мониторинг химиочувствительности опухолевых клеток на разных этапах терапии у конкретного пациента [118]. В этом случае, изменение химиочувствительности клеток в каждый период заболевания выступает в роли интегративного теста, характеризующего возможность ответа организма на лечение [117];

3) выбрать наиболее рациональную схему терапии применительно не только к гистологическому типу опухоли, степени ее злокачественности, цитологическому, генетическому и биохимическому статусу, но и индивидуально-возрастной чувствительности клеток пациентов. Чувствительность-адаптированная терапия, основанная на доклинической и клинической диагностике химиочувствительности опухолевых клеток *ex vivo*, уже применяется для лейкозов, являясь более адекватным основанием и предпосылкой для принятия решения о выборе тактики персонализированного лечения перед риск-адаптированным [117]. В основе последнего лежит оценка ряда молекулярно-генетических и фенотипических свойств клеток, что однозначно не прогнозирует чувствительность к конкретным противоопухолевым препаратам у каждого пациента [117];

4) провести скрининг как потенциально отобранных для применения, находящихся в обращении, так и новых противоопухолевых веществ с предсказанием степени диагностической, прогностической эффективности их назначения и исключением неэффективных соединений [116, 117, 119];

5) изучить характер взаимодействия химиопрепаратов друг с другом на предмет выявления их аддитивных, синергетических или антагонистических эффектов;

6) исследовать механизмы общей лекарственной и перекрестной резистентности, их изменение в процессе опухолевой прогрессии в соответствии с профилем антигенов, также как возможность подавления устойчивости ее специфическими ингибиторами; выявить группу пациентов с повышенным риском рецидива при учете клинической картины, цитологических, иммунохимических, биохимических и молекулярно-генетических показателей [16, 116, 117].

Однако, существует ряд моментов, которые необходимо учитывать при интерпретации получаемых данных на организм пациента:

1) дозы химиопрепаратов, действующие на клетки, подбираются эмпирически. Минимальной считается такая их концентрация в культуральной среде, которая эквивалентна разовой дозе химиопрепарата в сыворотке крови, рассчитанной на площадь поверхности тела пациента [14].

2) фармакокинетические параметры (клиренс) химиопрепаратов, которые обуславливают несоответствие их количества в среде для культивирования;

3) нередко *in vitro* испытываются отдельные соединения, тогда как в медицинской практике применяются поликомпонентные схемы терапии;

4) гетерогенность клеточного состава опухолей [120];

5) пролиферативная активность, хорошо контролируемая в лабораторных условиях, в организме находится под влиянием ростовых факторов, цитокинов экстрацеллюлярного матрикса, стромальных элементов опухоли и гормонов [14];

- б) начальная плотность клеток и тип подложки;
- 7) длительность экспозиции клеток опухолей с препаратами [116, 119, 121].

Вышеизложенные моменты способствовали созданию ряда методов прогнозирования клинической эффективности химиопрепаратов. Среди них наибольшее распространение получили следующие.

1) Пролиферативный тест (proliferative test – РТ), в котором оценивается степень подавления индекса пролиферации по включению меченных аминокислот и оснований (³Н-тимидина, -уридина, -метионина, ¹³⁵І-метионина, бромдезоксимуридина) во вновь синтезируемую ДНК готовящимися к делению клетками с последующим сцинтилляционным подсчетом импульсов на β-, γ-счетчиках (метод автордиографии), абсорбционном ридере или проточном цитометре [11, 16, 117, 120, 122].

2) Одним из вариантов данного метода является оценка чрезмерной лекарственной резистентности (extreme drug resistance assay – EDRA). В этом методе используется ³Н-тимидин, но не требуется суспензии одиночных клеток в качестве образцов для тестирования. Измельченную ткань инкубируют с одним или несколькими химиопрепаратами 5 сут в дозах, превышающих физиологические в 5–80 раз, затем добавляют радиоактивный тимидин, захват которого оценивают через равные промежутки времени. Только живые, сверхустойчивые к химиопрепаратам клетки захватывают метку. Степень поглощения тимидина прямо коррелирует с резистентностью клеток к химиопрепаратам. Интерпретация результатов уникальна тем, что данный показатель выявляется как противоположный химиочувствительности [123].

3) Флуоресцентный анализ микрокультур на цитотоксичность (fluorescent microculture cytotoxicity assay – FMCA). Этот метод по сути является упрощенным вариантом пролиферативного теста, в котором клетки линий и клетки глиомы пациентов, соединяются с микропереносимыми тканевыми культуральными тельцами (бусинками), а после экспозиции с химиопрепаратами, метятся витальным красителем – гидроэтидином. Это позволяет напрямую использовать количественную флуоресценцию, обойти экстракцию, сцинтилляционный подсчет и тем самым ускорить скрининг потенциальных противоопухолевых препаратов [124].

4) Аналогичный принцип – степень подавления митоза положен в основу метода определения гистокультуральной лекарственной резистентности (histoculture drug resistance assay – HDRA). В этом методе применяют фрагменты опухолевой ткани размером 1–2 мм, размещенные на коллагеновой подложке и способные расти в трехмерном пространстве. Спустя 24 ч после посева, экспланты инкубируют в течение 3 сут с химиопрепаратами и заливают парафином. Критерием оценки цитотоксичности химиопрепаратов служит степень подавления индекса пролиферации клеток, измеряемая радиографически по снижению

радиоактивности метки, либо уменьшению поглощения 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ тест) [125, 126, 127].

5) Ингибирование деления опухолевых клеток может быть изучено с помощью нетоксического красителя alomar blue, метаболизируемого митохондриальной редуктазой, конвертирующей не испускающий световые лучи резафурин. Интенсивность флуоресценции регистрируют на микрофотометрах, спектрофлуориметрах или спектрофотометрических ридерах [118].

6) К разряду косвенных показателей чувствительности клеток следует отнести тест с сульфородамино Б, который применяется для скрининга цитотоксических препаратов [55]. Он основан на определении белкового синтеза посредством флуоресцентного красителя сульфородамина Б, который с высоким сродством связывается с остатками основных аминокислот белков, с последующей фиксацией образовавшихся комплексов трихлоруксусной кислотой и колориметрической оценкой общего белка, соответствующего количеству жизнеспособных клеток. Кислота способствует связыванию сульфородамина Б клетками, а в щелочных условиях краситель экстрагируется, и после растворения, подвергается спектрофотометрическому измерению [122].

7) Метод окрашивания метилтетразолием (МТТ) основан на способности митохондриальных лактат- и сукцинатдегидрогеназ жизнеспособных клеток превращать в течение 2–6 ч инкубирования соль 3-[4,5-диметил-2-тиазол]-2,5-фенил-2,4-тетразолий бромид (МТТ) в фармазан в присутствии феназинмоносульфата (PMS). С помощью солюбилизаторов (диметилсульфоксид, изопропанол) его кристаллы переводят в растворимую (окрашенную) форму, оптическую плотность которой регистрируют спектрофотометрически при длине волн 570–690 нм. Метаболизируют МТТ только жизнеспособные клетки. Превышение 50%-го торможения роста свидетельствует о чувствительности клеток к данному веществу. Чувствительность метода лежит в диапазоне от 1000 до 50 000 клеток/лунку [11, 116, 117, 119, 120, 121].

8) Колониеформирующий анализ (colonic formation assay – CFA) основан на клоногенных свойствах стволовых клеток, т.е. их способности образовывать колонии в монослое. Метод обладает высокой прогностической значимостью при оценке чувствительности к стандартным и экспериментальным химиопрепаратам [15, 128, 129].

9) Вариантом колониеформирующего анализа является метод оценки лекарственной чувствительности стволовых опухолевых клеток человека – HTDA (human tumor stem cell drug sensitivity assay). При данном методе проводится 1 ч экспозиция раковых стволовых клеток, находящихся в стадии двухнедельного роста колоний, с химиопрепаратами для оценки их

действия. Противоопухолевый эффект химиопрепаратов определяют по индексу ингибирования формирования колоний [15, 122].

10) Дифференцированное окрашивание клеток на цитотоксичность (differential staining cytotoxicity assay – DiSC) основано на неодинаковой способности к поглощению гематоксилин-эозина нормальными и опухолевыми жизнеспособными клетками, а также прочного зеленого (fast green) погибшими клетками в зависимости от проницаемости их мембран. Интактная мембрана препятствует поглощению красителей. Таким образом, удается определить долю погибших клеток в результате применения химиопрепаратов. Лекарственную чувствительность измеряют как соотношение выживших клеток в обработанных препаратами посевах к их количеству в необработанных контролях, которое должно составлять не менее 80% жизнеспособных клеток [116, 118, 120, 130, 131].

11) На этом методе основывается внеорганизменный анализ программированной клеточной гибели (*ex vivo* analysis of programmed cell death – EVA/PCD), выявляющий маркеры апоптотической и неапоптотической гибели клеток. Опухолевый материал дезагрегируют с помощью ДНКазы или коллагеназы IV до кластеров нужных размеров (50–100 клеточных сфероидов). Так как содержащиеся в них клетки не пролиферируют, сфероиды создают условия, наиболее приближенные к существующим для опухолей в организме человека. После суточной обработки опухолей химиопрепаратами, к ним добавляют смесь, состоящую из нигрозина Б, красителя прочного зеленого и, фиксированных глутаральдегидом, эритроцитов. Образцы окрашивают гематоксилином–эозином. Гибель клеток оценивают при их дифференциальном подсчете по окрашиванию в зависимости от целостности мембран [132]. Поскольку образование сфероидов классическим путем достаточно сложная и трудоемкая задача, а некоторые клеточные линии вообще их не образуют, предполагается выращивание клеток в полупроницаемых полимерных микрокапсулах, создаваемых на основе альгината и L-полилизина [133].

12) Изучение химиочувствительности глиом человека проводят по мечению и поглощению витальных флуоресцентных красителей – гидроэпидина и Hoechst 33342, одних или в комбинации с зондами, предназначенными для определения метаболизма и пролиферации клеток [124].

13) Оценка выживаемости клеток по уровню аденозинтрифосфорной кислоты (adenosine triphosphate cell viability assay – ATP assay) способствует количественному подсчету жизнеспособных клеток, обработанных химиопрепаратами, так как апоптотические клетки по причине утраты своей целостности, содержат более низкое количество аденозинтрифосфата (АТФ). Добавляют реагент – люцеферин/люцеферазу, который катализирует распад АТФ до аденозинди(моно)фосфата (АДФ, АМФ) и люцеферина, с испусканием флуоресценции,

интенсивность которой пропорциональна метаболической активности субстрата и улавливается люминометром или β -счетчиком. Уменьшение АТФ указывает на лекарственную чувствительность, а отсутствие ее снижения – на устойчивость к тестируемым препаратам [118].

14) Анализ кинетики, индуцированного химиопрепаратами апоптоза в микрокультурах клеток (microculture kinetic drug induced apoptosis assay – MiCK). Метод предназначен для выявления наиболее эффективных химиопрепаратов по профилю чувствительности к ним раковых клеток пациентов в тканевых, костномозговых и жидкостных образцах, полученных во время оперативного вмешательства. Данный тест неинвазивен, выполняется на малом объеме опухолевой ткани, жидкости или образцах костного мозга. Результаты помогают клиницистам сориентироваться в наиболее предпочтительных препаратах для конкретного пациента до начала терапии [117, 134].

15) Проточно-цитометрическое определение химиочувствительности (flow cytometric chemosensitivity assay – FCCA), выполненное на 30 детях с острым лимфобластидным лейкозом. Данный метод позволяет количественно оценить число жизнеспособных клеток в суспензии по результатам их флуоресценции при окрашивании флуоресцеин диацетатом и пропидий йодидом (PI) в изотоническом растворе после 1–4 ч экспозиции с химиопрепаратами. При использовании данного метода можно отличать интактные жизнеспособные от мертвых клеток, а также бластные клетки лейкемии от нормальных лейкоцитов в клинических образцах [118, 135].

16) Тест определения лекарственной чувствительности клеток, инкорпорированных в коллаген-геле (collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test – CD-DST). Он позволяет количественно определить чувствительность клеток из биопсийных образцов к противоопухолевым препаратам без контаминации фибробластами [136].

17) Полуавтоматическая система обработки микроскопических флуоресцентных цифровых изображений (a semiautomatic fluorescence-based digital image microscopy system – DIMSCAN), создаваемая флуоресцеин диацетатом, избирательно накапливающихся в жизнеспособных клетках на фоне тушения флуоресценции эозина Y погибшими клетками [137]. Метод обладает рядом преимуществ. Во-первых, он позволяет сканировать 96-луночный планшет (даже с единичными флуоресцирующими клетками в каждой лунке) в течение 6 мин. Во-вторых, чувствительность метода лежит в диапазоне 4–5 порядков (от единичных до миллиона клеток), давая возможность точно тестировать комбинации химиопрепаратов, оценивая их синергетические, аддитивные и антагонистические эффекты, не доступные МТТ анализу. Таким образом, этот тест целесообразно использовать для выявления противоопухолевой активности комбинаций препаратов в доклинических испытаниях [137].

Ряд иных способов опираются на такие критерии как активность ацетилхолинэстеразы, люцеферазы, топоизомеразы-II или экстрацеллюлярный выход лактатдегидрогеназы, ацетилхолинэстеразы и др. [138].

Существуют и другие методы, которые могут применяться для исследования ответа *in vitro* опухолевых клеток на химиопрепараты: опухолевый ответ на противоопухолевые соединения (tumor response to anti-neoplastic compounds – TRAC), метод оценки химиочувствительности и химиорезистентности (chemotherapy sensitivity and resistance assay–CSRA), *in vitro* chemosensitivity assays – CSA [118] и ChemoFx [139].

Обладая положительными моментами, рассмотренные методы не лишены технических и теоретических проблем [120].

1) Точность МТТ подвержена существенному влиянию рН экстрагирующего буфера, так как его смещение на 5 единиц в сторону увеличения порождает ложные сигналы, а модификация состава ведет к полному растворению визуализируемых зерен фармазана [121]. МТТ дает сопоставляемые показатели при наличии в образцах не менее 80% бластных клеток. Результаты признаются статистически значимыми, когда спустя 4 сут выращивания клеток, в контроле сохраняется 70% жизнеспособных клеток [128,140].

2) Хотя DiSC (в отличие от МТТ) позволяет использовать материал со значительной примесью нормальных клеток (однако не более 30%), он остается трудоёмким, относительно субъективным и требующим квалифицированного персонала, обладающего навыками окрашивания и микроскопического подсчета [116, 130].

3) При клониеформирующем анализе нарушаются межклеточные взаимоотношения. Имеется вероятность того, что опухолевые клетки в большинстве своем не делятся (G_0), тогда как клетки, образующие колонии, пролиферируют. Не исключается, что клониеобразующие клетки могут оказаться не подлинными стволовыми клетками. Наконец, CFA оценивает численность погибших клеток в крайне узком диапазоне, тогда как клинические ответы требуют, чтобы гибель клеток находилась в широком диапазоне [15, 128].

4) Результаты зависят от разбежки: в конfluenceности посевов, в длительности инкубации (от 1 ч до 4 сут, чаще 2–4 сут) [119], в интервалах времени между окончанием обработки и началом учета результатов, а также десятикратное расхождение чувствительности для разных типов клеточных линий (в частности, глиальной природы) на один и тот же химиопрепарат, что подтверждено метаанализом 1643 публикаций, посвященных химиотерапии глиом [121]. Исходя из значений ИК₅₀, наибольшую чувствительность проявляла глиома крысы С6 к актиномицину D (ИК₅₀ – 0,042 мкг/мл), резистентность – SNB56 к ломустину (ИК₅₀ – 76,7 мкг/мл), а промежуточное положение занимают линии U87MG и U251MG глиом человека [121].

5) При контакте опухолевых клеток со стромой (через интегрины, белки экстрацеллюлярного матрикса) реализуются механизмы избегания ими апоптоза, которые обозначаются как стромальный фактор резистентности [52]. С другой стороны, стромальная устойчивость преодолевается повышением концентрации химиопрепаратов. Вместе с тем, химиорезистентность опухоли возникает, когда терапия оказывается неадекватной лекарственной чувствительности клеток [118, 141].

6) Использование высокоскоростного сортера или магнитного сепаратора клеток для получения нужной субпопуляции, увеличивает время, необходимое для проведения анализа и оформления ответа с 1–3 до 10 сут [118].

В литературе приводятся результаты пока спорадических попыток сравнения методов тестирования *in vitro* химиопрепаратов с результатами клинического их использования. Пациенты (70,6%) с протоплазматическими астроцитомами, олигодендроцитомами и ГБ, получавшие химиопрепараты (фторурацил, сарколизин, метотрексат), ранее выбранные *in vitro* как наиболее эффективные, имели медиану выживаемости 38 мес. наблюдения без рецидивов и при хорошей реабилитации [16].

Из сказанного вытекает потребность и необходимость разработки методологии проведения доклинической персонафицированной оценки химиочувствительности клеток интракраниальных опухолей, создания на ее основе предсказательных моделей чувствительности и устойчивости опухолевых клеток. Лабораторное обеспечение персонафицированной терапии связано с созданием для клинической практики, с одной стороны, малозатратных в экономическом и производственном отношении методов, а с другой – эффективных по информативности и доступности для клинко-диагностической лаборатории [142]. Кроме того, постоянный мониторинг цитостатической чувствительности опухолевых клеток препятствует ненадлежащему использованию дорогостоящих химиопрепаратов, которые (в случае нечувствительности к ним клеток) вызывают лишь неоправданные токсические эффекты [117]. Вышеизложенное побудило автора обратиться к наиболее простому по исполнению, оперативному, относительно дешевому и, вместе с тем, не уступающему по чувствительности варианту определения лекарственной цитотоксичности, каковым является анализ эксклюзии красителя (*dye exclusion assay*) [131]. Он основан на принципе непроницаемости цитоплазматической мембраны нормальных клеток для витальных красителей и утрате этой способности клетками с нарушением целостности мембраны. Таким образом, удастся определить численность сохранивших и утративших жизнеспособность клеток, и по их соотношению судить о цитотоксическом действии тестируемых химиопрепаратов [116]. При данном способе тестирования применяют различные красители (прочный зеленый, кристаллический фиолетовый, нейтральный красный, эозин, нигрозин Б,

акридиновый оранжевый и другие) и, в том числе, синтезируемый еще в 1904 г. Паулем Эрлихом – трипановый синий, широко используемый в лабораторной практике [143]. Анализ по трипановому синему относительно скор, прост, малозатратен, требует небольшого количества клеток и, при соблюдении ряда условий, гарантирует достаточную результативность [143]. Это предопределило предпочтительность выбора автора в пользу тестирования с трипановым синим. Принимая во внимание перечисленное, в указанный метод были предвнесены модификации, позволяющие обойти очерченные «проблемы» и адаптировать его к интракраниальным опухолям, поскольку большинство методов разработано с применением лейкозных клеток [116, 117, 118, 131, 142], тогда как опухолям мозга уделялось гораздо более скромное внимание [11, 16, 120, 125].

1.4. Структурные особенности фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37, их локализация и эффекты на нормальные и опухолевые клетки человека

1.4.1. Структурные особенности фактора роста нервов, его локализация и эффекты на нормальные и опухолевые клетки

NGF - первый ростовой фактор, открытый в 1948 г. Виктором Хамбургером и Ритой Леви–Монтальчини на мышинной саркоме S180 [144]. NGF - димерный секретируемый белок сыворотки крови (7S форма, 140 кДа), состоящий из пяти 2α , 2γ и β субъединиц. Только β -субъединица (2,5S форма, 13 кДа), состоящая из 118 аминокислот, обладает специфической активностью, α и γ -субъединицы защищают ее в крови от ферментативного протеолиза (рисунок 1.1).

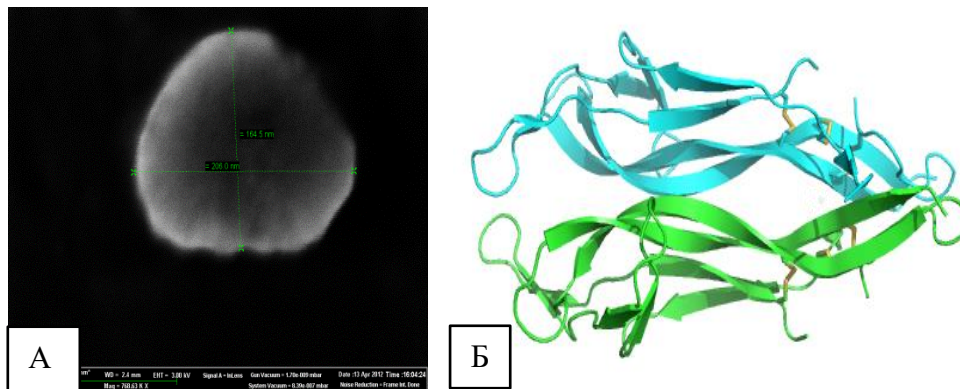


Рисунок 1.1. Электронная микрофотография (А, увеличение 250000) и третичная структура NGF (Б)

McDonald et al. в 1991 г. с помощью рентгеноструктурного анализа определили, что трехмерная структура NGF состоит из двух пар антипараллельных β -цепей и β -шпильки, соединенных между собой тремя дисульфидными связями [145].

В настоящее время NGF обнаружен во всех классах позвоночных: рыбы, рептилии, птицы, млекопитающие и человек, во всех органах и тканях организма: как нормальных, так и патологически измененных (опухолевая ткань) [146].

Однако, в наибольшем количестве NGF присутствует в ЦНС: в симпатических, холинергических нейронах и глиальных клетках гиппокампа, базальных ядер переднего мозга и коре головного мозга (рисунок 1.2).

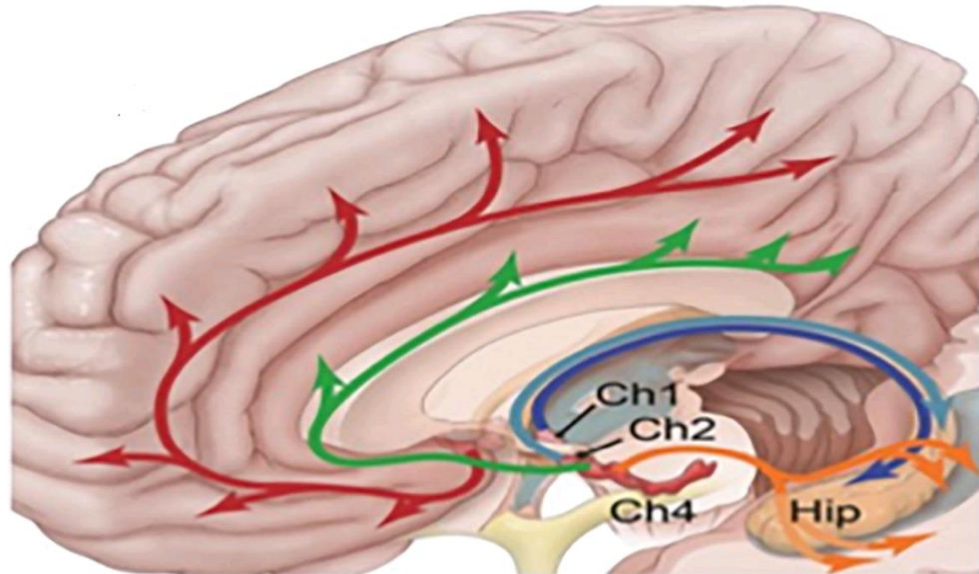


Рисунок 1.2. Локализация NGF в структурах головного мозга
Ch1-Ch4 – холинергические проекции, Hip – гиппокамп [147]

В них NGF ускоряет рост нейритов, тем самым симулирует дифференцировку, поддержание жизнеспособности и синаптогенез [148]. Кроме того, NGF локализуется в подчелюстных слюнных железах [22], предстательной железе [149], желудке [150], гепатоцитах [151] и эпителиоцитах роговицы [152]. В них NGF стимулирует пролиферацию клеток предстательной [153], поджелудочной [154], молочной желез [155] и желудка [156].

Однако, установлено, что NGF интенсивно синтезируется и секретируется опухолевыми клетками: рака желудка [150], щитовидной [157], молочной [155], предстательной [149], поджелудочной желез [154], глиомы C6 [158], линий нейробластомы IMR-32, SH-SY5Y, SK-N-SH, NB-GR [159] и крысиной феохромоцитомы PC12 [160]. Экспрессия NGF повышена при первичном раке щитовидной [157], молочной желез [161] и рака яичников [162], в которых NGF стимулирует пролиферацию, миграцию и метастазирование.

Интересно, в присутствии NGF клетки медуллярной феохромоцитомы и рака предстательной железы прекращают свое деление и преобразуются в нейроноподобные клетки при торможении образования ДНК, появлении отростков, формировании псевдоганглиев и электрической возбудимости мембраны [162, 163]. Вместе с тем, опыты показывают, что NGF оказывает и цитотоксические эффекты: стимулирует апоптоз гепатоцитов [151], клеток нейробластомы IMR-32, SH-SY5Y, SK-N-SH, NB-GR [159], макропиноцитоз Daou клеток медуллобластомы [164], аутофагию швановских клеток [165] и ингибирование ангиогенеза нейробластомы [28]. Также NGF уменьшает *in vivo* число и размер индуцированных нитрозомочевинной неврином, скорость их пролиферации и пролонгирует выживаемость мышей

после подкожной инъекции или интрацеребральной имплантации клеток анапластических глиом F98, T9 и невриномы [88].

1.4.2. Структурные особенности кателицидина LL-37, протегрина-1, их локализация и эффекты на нормальные клетки

Два отличающихся по структуре пептида LL-37 и PG-1 объединены в одно семейство на основании сходства их белков предшественников. Белки-предшественники АМП семейства кателицидинов состоят из N-концевого сигнального пептида (30 аминокислот), высококонсервативной области – кателинового домена (около 100 аминокислот) и варибельного участка (пептидный домен). В частности, единственный представитель семейства кателицидинов у человека – пептид LL-37 представляет собой катионный амфифильный АМП (молекулярная масса 4,5 кДа), содержащий 37 аминокислот (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPVPTES), включая два N-концевых остатка лейцина, вследствие чего он и получил свое название. Этот пептид образуется из белка-предшественника, имеющего молекулярную массу 18 кДа – hCAP-18, кодируемого геном *SAMP*, в результате внеклеточного или внутриклеточного протеолиза данного белка сериновой протеиназой-3 между остатками аланина и лейцина [166, 167]. Исследования с помощью ядерного магнитного резонанса показали, что LL-37 находится в α - конформации при связывании с мембранами клеток [36, 168, 169] (рисунок 1.3).

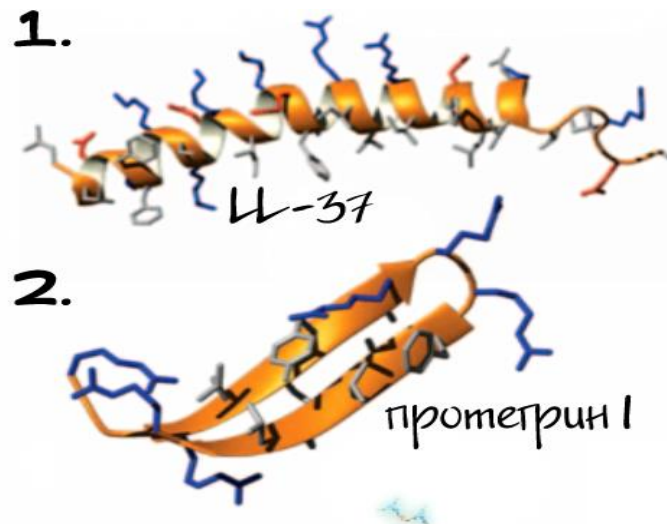


Рисунок 1.3. Пространственные структуры кателицидина LL-37 и протегрина-1 [170]

Протегрин-1 также относится к семейству кателицидинов и представляет собой катионный АМП из 18 аминокислот (RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH₂), имеющий β -шпильчатую структуру, стабилизированную двумя дисульфидными связями (рисунок 1.3). Впервые PG-1 был обнаружен в нейтрофилах свиньи *Sus scrofa*, а к настоящему времени у него идентифицировано 5 изоформ [171, 172].

Оба рассматриваемых пептида присутствуют в клетках, выполняющих защитные функции. Например, LL-37 локализуется во вторичных гранулах нейтрофилов [173] и эпителиальных клетках яичка, шейки матки [174], дыхательных путей [175], желудочно-кишечного тракта, а также в небольших количествах содержится в: макрофагах, моноцитах [176], тучных и дендритных клетках, естественных киллерах, лимфоцитах [177], миелоидных клетках костного мозга [174], кератиноцитах кожи [178] и в слюне [179, 180]. LL-37 проявляет цитотоксическую активность в отношении нетрансформированных эндотелиоцитов и лимфоцитов, но не оказывает цитотоксического действия на фибробласты десны и линию клеток HaCaT кератиноцитов человека [36, 180]. Экспрессия гена *CAMP* в большинстве эпителиальных клеток является конститутивной, однако в кератиноцитах она индуцируется бактериальной инфекцией, компонентами бактериальных клеток, например, липополисахаридами, TNF- α , витамином D₃, бутиратом, некоторыми короткоцепочечными жирными кислотами [166, 181]. В низких концентрациях (нано-, пиколярных) LL-37 стимулирует хемотаксис нейтрофилов, моноцитов, дендритных и Т-клеток, ангиогенез, пролиферацию, миграцию эпителиальных клеток и секрецию цитокинов (рисунок 1.4) [36, 181, 182].

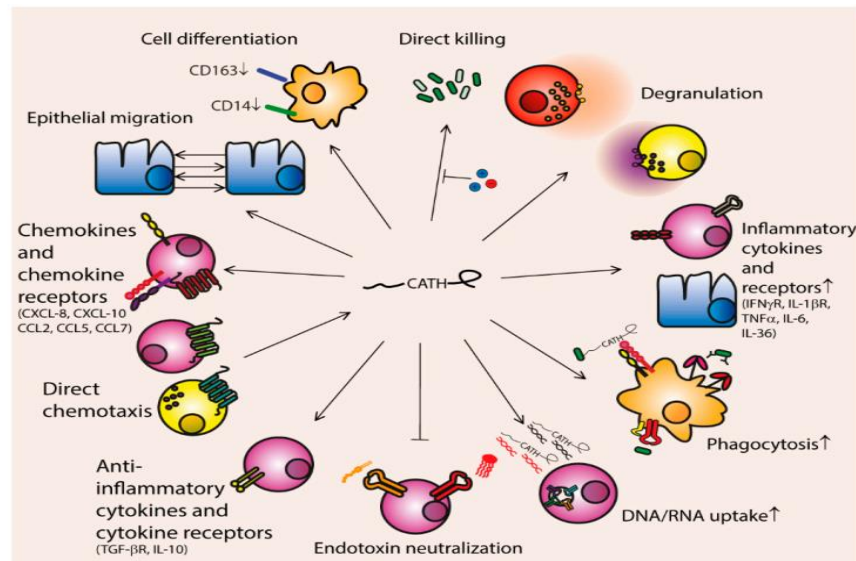


Рисунок 1.4. Функции кателицидинов [183]

CATH – кателицидины; cell differentiation – дифференцировка клеток; epithelial migration – миграция эпителиоцитов; chemokines and chemokine receptors – хемокины и их рецепторы; direct chemotaxis – прямой хемотаксис; direct killing – непосредственное уничтожение; degranulation – дегрануляция; inflammatory cytokines and receptors – воспалительные цитокины и их рецепторы; phagocytosis – фагоцитоз; DNA/RNA uptake – поглощение ДНК/РНК; endotoxin neutralization – нейтрализация эндотоксина; anti-inflammatory cytokines and cytokine receptors – противовоспалительные цитокины и их рецепторы; CD163, CD14 – кластеры дифференциации 163 и 14 соответственно

Эти процессы способствуют заживлению ран, регенерации тканей и поддержанию гомеостаза, что играет важную роль для реализации защитных функций, но могут быть ассоциированы с развитием рака при протекании хронических инфекций, воспалительного процесса, иммунных, аллергических, аутоиммунных заболеваний, так как повышают способность опухолевых клеток к миграции, инвазии и стимулируют ангиогенез (рисунок 1.4).

Интересно, что LL-37 также обнаружен в опухолях: эпителиальной аденокарциноме легкого (A549), эпителиоидной карциноме (A431), трансформированных вирусом Эпштейна–Барр (EBV) В-клетках, в клетках острого миелоидного лейкоза (HL-60, MG63), эритромиелолейкоза (K562), лимфомы (U937), гепатомы (Hep22a), в эпителиальных клетках рака толстой кишки (HT-29, HCT116) плоскоклеточного рака полости рта, клетках MCF-7, MDA-MB-435s, MDA-MB-231 молочной, поджелудочной, предстательной желез, клетках A375 и A875 меланомы, желудка, яичников, глиомы и нейробластомы [166, 181, 184, 185, 186, 187].

С одной стороны, LL-37 обладает цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, проявляя ряд эффектов, позволяющих предположить участие LL-37 в канцерогенезе [166, 181]. Показано, что пептид регулирует апоптоз и остановку клеточного цикла, что в ситуации дисбаланса между апоптозом и пролиферацией может способствовать образованию опухолей [181, 188].

Протегрины не имеют столь широкой локализации и содержатся лишь в специфических гранулах нейтрофилов. PG-1 оказывает цитотоксическое действие на большинство опухолевых клеток и обладает низкой цитотоксичностью в отношении фибробластов и ряда других клеток, в частности, макрофагов 3D4/2 [172]. Однако, как установлено в *in vitro* экспериментах, он может в бессывороточной среде повреждать нормальные клетки крови человека – эритроциты, лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, а в присутствии компонентов сыворотки крови эти эффекты существенно менее выражены. Протегрины проявляют высокую антимикробную активность в отношении широкого спектра микроорганизмов: грамположительных, грамотрицательных бактерий, грибов и вирусов [171, 189]. Однако, интересно, что PG-1 оказывает цитотоксическое действие на большинство опухолевых клеток [172]. В последнее время установлено, что АМП могут не только продуцироваться и секретироваться разнообразными клетками во внеклеточное пространство, но и проникать в различные клетки организма, тем самым оказывая влияние на процессы их жизнедеятельности.

1.5. Механизмы действия химиопрепаратов, фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на клетках интракраниальных опухолей

1.5.1. Механизмы действия LL-37 и PG-1 на опухолевые клетки

Избирательность действия LL-37 и PG-1 на опухолевые клетки объясняется различием липидного, белкового состава их мембран по сравнению с нормальными клетками. Мембраны

опухолевых клеток имеют высокий отрицательный заряд вследствие наличия относительно большого количества кислых фосфолипидов (фосфатидилсерина), сиалированных гликопротеинов, гликолипидов и O-гликозилированных муцинов [166, 179, 190, 191]. Причиной увеличенного содержания гликозилированных компонентов в мембранах является нарушение экспрессии генов гликозилтрансфераз [192]. Повышенное содержание фосфатидилсерина и сиаловых кислот в мембранах опухолевых клеток приводит к возрастанию текучести вследствие менее плотной упаковки липидов, что увеличивает чувствительность клеток к катионным LL-37 и PG-1 [193]. Исследования с помощью ядерного магнитного резонанса показали, что при взаимодействии LL-37 с мембранами наблюдается инверсия слоев положительно заряженных фосфолипидов вследствие изменения конформации их головок [36, 194]. При этом структура фосфолипидов и гидрофобные взаимодействия между их углеводородными хвостами и катионными группами LL-37 влияют на поверхностную кривизну мембраны и способствуют дестабилизации ее пространственной организации, образованию трансмембранных пор и разрушению белок-липидных комплексов [195]. Исследования показали, что ферментативное расщепление остатков сиаловых кислот на мембранах опухолевых клеток уменьшает противоопухолевую активность катионных АМП [196]. Следовательно, критически важным для связывания LL-37 и PG-1 с опухолевыми клетками является электростатическое притяжение между молекулами положительно заряженных аминокислот АМП и отрицательно заряженными компонентами мембран клеток [36, 166]. Однако, в мембранах опухолевых клеток может наблюдаться повышенное содержание холестерина, которое увеличивает жесткость мембран и препятствует проявлению противоопухолевого действия LL-37 [197, 198].

Исследования на эпителиальных клетках легких A549 человека с применением брефельдина А и нокодазола – ингибиторов эндоцитоза и микротрубочек соответственно показали, что проникновение LL-37 внутрь клеток происходит путем эндоцитоза, а внутриклеточный транспорт пептида к ядру опосредуется микротрубочками. Эти процессы также влияют на сборку, секрецию везикул и презентацию антигенов [199]. Активация эндоцитоза LL-37 наблюдается при его связывании с участком мембраны, где локализуются G-белок-связанные FPR2 рецепторы.

В последнее время установлено, что LL-37 может связываться с несколькими мембранными рецепторами, что объясняет разнообразие его эффектов в отношении разных типов клеток. LL-37 взаимодействует с четырьмя G-белок-связанных рецепторов (GPCR): рецептором N-формилпептида-2 (FPR2), CXС хемокина-2 (CXCR2), Mas-ассоциированным с геном X (MrgX2), пуриnergическим (P2Y11) рецепторами [166, 199]. Активация P2X7 стимулирует выход K^+ из клетки, а также каспазы-1 и секрецию провоспалительных

интерлейкинов IL-1 β и IL-18 [200, 201], полиморфизм генов которых ассоциирован с развитием опухолей [202, 203]. Кроме того, LL-37 связывается с рецепторными тирозинкиназами (RTK): рецепторами-1, -2 эпидермального фактора роста (EGFR/ErbB1, ERBb2) и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1R) (рисунок 1.5) [188, 199].

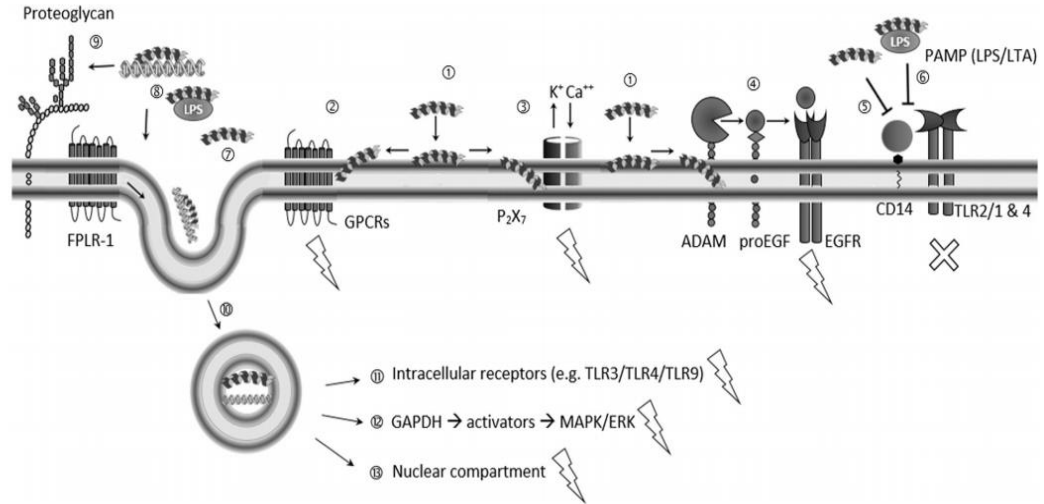


Рисунок 1.5. Механизмы действия LL-37 на клетку человека [204]

Proteoglycan – протеогликан, FPLR-1 (FPR2) - формилпептидные рецепторы, GPCR – G-белок связанные рецепторы, P₂X₇ – пуриnergический рецептор-7, K⁺, Ca⁺⁺ – K⁺, Ca⁺⁺-канал, ADAM – дезинтегрин и металлопротеиназа, proEGF – предшественник эпидермального фактора роста, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, CD14 - мембранный гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок, TLR2/1 & 4 -толл-подобные рецепторы-2, -1, -4, PAMP (LPS/LTA) – связанные с патогенами молекулярные паттерны, LPS -липолисахарид, LTA -липотейхоевая кислота, intracellular receptors – внутриклеточные рецепторы, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, activators – активаторы, MAPK/ERK – митогеном-активируемая протеинкиназа, nuclear component – ядерный компонент

Взаимодействие LL-37 с IGF1R индуцирует пролиферацию и метастазирование опухолей через β -аррестин-1-зависимую активацию MAPK/ERK каскада [189, 205]. Лиганд связывается с этими рецепторами неспецифически с низкой аффинностью посредством изменения конформации липидного бислоя мембраны, активирующего трансмембранные домены рецепторов EGFR и P₂X₇R [204]. Кроме того, LL-37 может активировать мембранные металлопротеиназы ADAM, которые высвобождают закрепленные в мембранах факторы роста, а те, в свою очередь, трансактивируют EGFR [206]. LL-37 связывается с лиганд-управляемым ионным каналом (LGIC) и Toll-подобными рецепторами (TLR) [206]. Последние подразделяются на мембранные: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 и эндосомальные: TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 [181, 207]. Интересно, что с помощью эндоцитоза LL-37 может транспортировать внеклеточную ДНК внутрь клеток, где она взаимодействует с

внутриклеточным TLR9 рецептором, вызывая продукцию интерферона- α (IFN- α) [208, 209].

В результате эндоцитоза и таких рецепторных взаимодействий LL-37 активирует внутриклеточные белки: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) [181], проапоптотический белок Bcl-2 семейства (Bax), апоптоз-индуцируемый фактор (AIF) и ингибирует активность теломеразы через стабилизацию с теломерным G-квадруплексом [210]. Например, взаимодействие LL-37 с GAPDH препятствует связыванию пептида с p38MAPK, а его высвобождение из комплекса LL-37-GAPDH приводит к активации данного пути, продукции, секреции провоспалительных хемокинов и канцерогенезу [211]. Помимо механизмов, запускающих внутриклеточные каскады, LL-37 индуцирует экспрессию CD86, CD103, CD141 молекул и маркеров – белка A семейства-9, содержащего C-типа лектиный домен (CLEC9A) и X-C мотив-содержащего хемокинового лиганда-1 (XCR1) на дендритных клетках и их дифференцировку. Такие «зрелые» дендритные клетки усиливают активацию и пролиферацию цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов и секрецию ими цитокинов и гранзимов, обеспечивающих противоопухолевый иммунитет [212].

Протегрин-1 посредством электростатических взаимодействий связывается с мембранами опухолевых клеток. Именно электростатическое взаимодействие между остатками аргинина PG-1 и фосфатными группами фосфолипидов, а также другими отрицательно заряженными компонентами мембран оказывается решающим для реализации его цитотоксических эффектов, хотя гидрофобные свойства этого пептида также играют важную роль для его встраивания в липидные мембраны [172]. При связывании PG-1 с липидным бислоем происходит его олигомеризация с образованием трансмембранных каналов (пор) [213, 214]. Поэтому различия липидного состава мембран опухолевых клеток могут обуславливать и различную цитотоксическую активность PG-1 [215]. Также как для LL-37, проникновение в клетки SynB3 и SynB5 – синтетических линейных аналогов PG-1 происходит путем эндоцитоза через интернализацию их в эндосомах и лизосомах [216]. В относительно высоких концентрациях (20-30 мкМ) PG-1 вызывает существенные повреждения клеточных мембран, что приводит к быстрой гибели клеток (в течение 5-10 мин) по пути некроза [217]. В более низких концентрациях (5–10 мкМ) пептид может инициировать процесс апоптоза [213].

Таким образом, как предполагается, механизмы проапоптотического действия PG-1 опосредовано реализуются через индукцию экспрессии генов *TP53* (белок p53), *CDKN1A* (ингибитор циклинзависимой киназы 1A или p21) и ингибирование ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA). Регуляция этих генов ингибирует прохождение клеточного цикла из G₁ в S-фазу, что блокирует деление раковых клеток и рост опухоли [216, 218]. Формируя трансмембранные поры, PG-1 индуцирует Ca²⁺ поток внутрь клетки, который запускает Ca²⁺-зависимые каскады, активацию белка p53, каспаз и апоптоз [213, 217].

Повреждающее действие пептида на мембрану клеток приводит к их гибели по пути некроза.

Однако, Hussin A. Rothan и коллеги наблюдали, что в результате обработки PG-1 клеток MCF-7 рака молочной железы имеет место повышение экспрессии онкогенов *MYC* и *ERBB2*, что способствует активации теломеразы, репарации повреждений ДНК и пролиферации раковых клеток [213, 219, 220].

Слабо изучены действия LL-37 и PG-1 на клетки глиомы и нейробластомы. В *in vitro* экспериментах односуточное действие LL-37 ингибирует дозо-зависимым образом (0–50 мкМ) жизнеспособность клеток U87G ГБ человека [221]. Установлено, что цитотоксическая активность рекомбинантного PG-1 в отношении SH-SY5Y клеток нейробластомы коррелирует с содержанием анионных сульфатированных протеогликанов в мембранах опухолевых клеток, т.е. определяется электростатическим взаимодействием [172]. Интересно отметить, что мембраны SH-SY5Y клеток нейробластомы имеют более сильный отрицательный заряд, чем в нетрансформированных клетках (фибробласты NIH-3T3), что может быть, отчасти, связано с транспортом ионов K^+ и Ca^{2+} клетками нейробластомы [172]. Эти факты частично объясняют селективную противоопухолевую активность PG-1.

1.5.2. Рецепторы фактора роста нервов TrkA, p75 и пути их сигнальной трансдукции

Все типы опухолей, а также нормальные клетки синтезируют ростовые факторы и экспрессируют рецепторы, что обуславливает возросший интерес к определению их значимости в онкогенезе [222, 223, 224]. Разнонаправленность вышеописанных эффектов NGF частично объясняется присутствием на клетках интракраниальных опухолей двух типов его рецепторов: TrkA, p75 и/или их комплексов [23]. Однако, спорным остается вопрос об экспрессии и локализации рецепторов Trk семейства на клетках опухолей. Одни ученые методом иммуногистохимии обнаруживают экспрессию TrkA и TrkB рецепторов в клетках ПА, АА и ГБ, полученных из операционного материала 10 взрослых пациентов [6, 225]. Другие – определяют экспрессию TrkA рецептора в 25–27% [225], третьи – в 67% опухолей [226], четвертые – только в результате их трансфекции [227], пятые – не наблюдают их на МБ [228]. Указанные рецепторы локализуются на пре- или постсинаптических мембранах, дендритах и сомах трансформированных нейронов [229]. Неоднозначность характерна для эффектов TrkA и p75 рецепторов в клетках интракраниальных опухолей [26, 230]. Авторы показывают, что экспрессия TrkA рецептора на нейробластомах служит благоприятным прогностическим маркером, связанным со спонтанной их регрессией, дифференцировкой и нейритогенезом [25, 225, 231]. Другие исследователи утверждают, что экспрессия этого рецептора предопределяет апоптоз [224, 226, 229], третьи – инвазию [232]. Активация TrkA рецептора усиливает рост клеток феохромоцитомы крысы PC12 и нейронов мозжечка, а его присутствие коррелирует с экспрессией маркера пролиферации Ki-67 (MIB-1) в МБ [226, 233]. Такие эффекты частично

могут быть связаны с изменением экспрессии TrkA, TrkB, TrkC рецепторов при трансформации нормальных нервных и глиальных клеток в опухолевые, а также в процессе озлокачествления опухолей [74, 222, 229]. Считается, что на ранних стадиях нейробласты экспрессируют TrkB рецепторы, присутствие которых сопряжено с агрессивным характером роста опухоли и ее неблагоприятным прогнозом у детей до трех лет [223]. При пролиферации клеток опухоли, данный рецептор сменяется на TrkA или на TrkC, что значительно улучшает прогноз лечения заболевания [223, 224]. Таким образом, эффекты NGF на клетки интракраниальных опухолей могут предопределяться типом экспрессируемых рецепторов, их комплексов, взаимоотношением последних [223] и доминирующим влиянием одного или нескольких сигнальных путей: фосфатидилинозитол-3-киназо (PI3K) [23, 234, 235], внеклеточным сигналом регулируемого киназного (ERK $\frac{1}{2}$), активируемого митогеном протеинкиназного (МАРК) [40, 222, 229], с-Jun-N-терминальная киназа/Ste20-связывающего пролин, аланин киназного (JNK/SPAK) [24, 55, 226], PTCH [55, 236, 237], Notch/Delta, протеинкиназ-C, -D (PKC, PKD) [229, 238], белка ретинобластомы (Rb), WNT, SHH [107, 239]; белка p73 [223, 228] (рисунок 1.6).

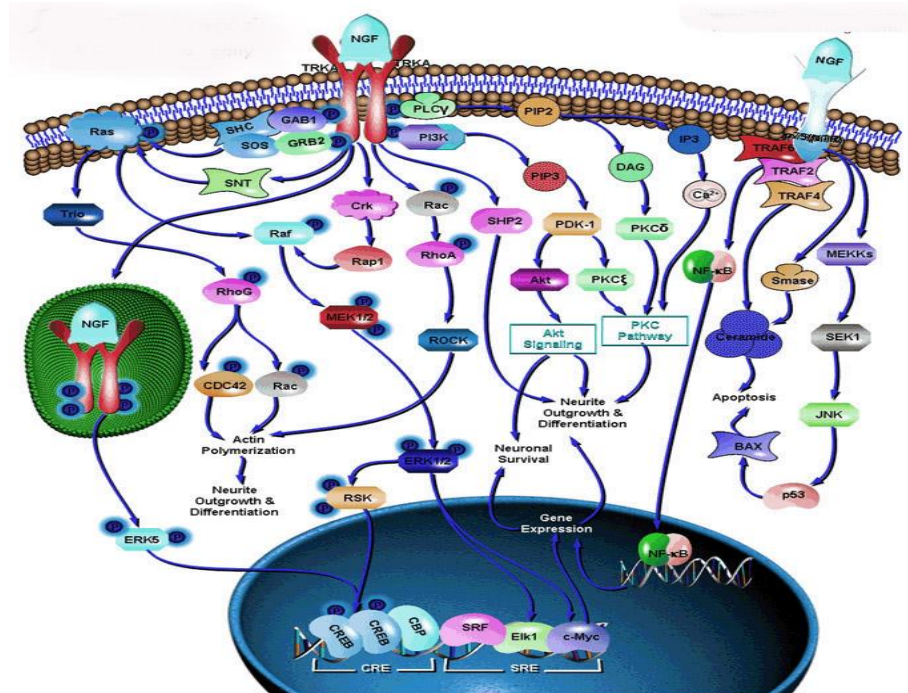


Рисунок 1.6. Сигнальные пути NGF в опухолевой клетке [55]

GAB1 – GRB2-ассоциируемый белок; GRB2 – адапторная молекула, рецептор-связывающего белка-2 ростового фактора; Src – протеин, гомологичный коллагену; RhoG, Rac1, RhoA – малые ГТФазы; Elk1 – Ets-родственный белок-1; RAP – протеин, ассоциируемый с рецептором; ROCK – Rho-киназа; PDK1 – Shp2-фосфоинозитид-зависимая киназа 1 протеинтирозинфосфатазы; TRAF2 – фактор 2, ассоциируемый с рецептором фактора некроза опухолей; SEK – протеинкиназа, активируемая стрессом/ERK киназа; Вах – проапоптотический белок Bcl-2

семейства; Crk – белок, связывающий субстрат (p130Cas); Cdc42 – циклин-зависимая киназа 42; PLC- γ – фосфолипаза C- γ ; DAG – диацилглицерол; Raf1 – V-raf-1 гомолог-1 вирусного онкогена лейкемии мыши; MEK1/2 – протеинкиназа, активируемая митогеном; PIP2 – фосфатидилинозитол-4,5 дифосфат; RSK – S6 киназа рибосомы

NGF активирует WNT, SHH, MAPK/NF- κ B, PI3K каскады [55, 107, 222, 223, 235], а другие подавляет: Notch, PTCH, JNK [55, 236]. Дискуссионным остается характер эффектов каждого из каскадов, что отчасти объясняется разновидностью экспрессируемых рецепторов и типом опухоли. Например, активация MAPK через TrkA рецепторы в клетках SH-SY5Y нейробластомы способствует дифференцировке и ингибированию митоза, тогда как тот же путь в МБ участвует в апоптозе [240]. Если же MAPK каскад активируется через p75 рецепторы, то наблюдается апоптоз нейробластом, но усиление пролиферации и выживания в МБ [24]. Неоднозначный характер носит фармакологическая проблема таргетирования внутриклеточных путей NGF для опухолей ЦНС [241, 242]

Белки сигнальной трансдукции, а также онкогены: *TRK* [24], *MYCN* [229] и гены-супрессоры: *TP53* [228], *PTEN* [243], транскрипционный фактор *Zhangfei* [226] могут являться мишенями для специфических ингибиторов или активаторов ростовых факторов. Применение которых усилит цитотоксическое действие химиопрепаратов в отношении клеток интракраниальных опухолей. К таковым субстанциям относятся: «белки-ловушки» нейротрофических факторов (TrkA-Fc, TrkB-Fc, TrkC-Fc) [227], ингибиторы PI3K, mTOR [235, 241]; ингибиторы TrkB – энтректиниб [244]; ретиноевая кислота [245, 246], моноклональные антитела [227]. Таким образом, сведения, касающиеся роли рецепторов p75 и TrkA в качестве таргетных мишеней действия комбинаций NGF с химиопрепаратами носят дискуссионный и противоречивый характер, что определяет актуальность дальнейшего их исследования.

1.5.3. Онкогены *MYCC*, *MYCN* и их роль в клетках интракраниальных опухолей

В состав *MYC*-семейства входят *MYCC*-, *MYCN*- и *MYCL*-онкогены [39, 229, 247]. *MYCC*- и *MYCN*-онкогены экспрессируются соответственно в 31% и 68–90% меланом, лимфом, нейробластом и МБ [39, 55, 248]. В зависимости от уровня экспрессии онкогенов, определяющегося количеством копий, различают инсерцию (менее 10 копий) и амплификацию (более 10 копий). Встречаемость инсерций *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов в МБ составляет 21–76,8% и 19% соответственно, амплификации – 4,3–7% и 4–16% [48, 248]. Сильная амплификация *MYCC*-онкогена наблюдается в 50% крупноклеточных (анапластических) МБ, а *MYCN* – в нейробластомах [55, 248, 249]. Экспрессия *MYC*-онкогенов в нейробластомах и МБ ассоциируется с высокой злокачественностью опухолей и низким (13%) показателем пятилетней общей выживаемости онкологических пациентов, которые умирают в течение одного месяца [48, 55, 61]. Установлена связь риска летального исхода пациентов с МБ от

численности копий онкогенов. В 3,5 раза увеличивается вероятность смерти пациентов при росте количества на каждые 10 копий для *MYCC* и в 1,7 раза – для *MYCN*-онкогенов [248]. Обозначенные ассоциации и высокие частоты экспрессии и амплификации *MYC*-онкогенов в клетках опухолей мозга послужили причиной признания их Международным обществом детской онкологии Европейского комитета по примитивной нейроэктодермальной опухоли (SIOP Europe PNET) в качестве официального молекулярного диагностического и прогностического маркера МБ у детей [39, 48]. В опухолях наблюдаются амплификация, мутации в *MYCC*-онкогене или его дерегуляция в результате чрезмерной активации или ингибирования сигнальных путей [237]. Например, активация WNT/ β -кадгеринового пути повышает адгезию и пролиферацию опухолевых клеток. Каскады при участии *MYCC* стимулируют экспрессию и активность гена теломеразы (*TERT*), РНК-полимераз-I, -II, -III, 5S-рибосомальной РНК, фактора-b элонгации транскрипции (TEF-b) [245, 250]. Продукты *MYCC*-онкогена связываются с супрессором (INI1/hSNF5), входящим в состав АТФ-зависимого хроматин-реорганизирующего комплекса (SWI/SNF), а также с протеинами, обладающими доменами трансформации/транскрипции (TRRAP), ацетилтрансферазой гистона (GCp-5) и рибонуклеопротеинами C1/C2, A/B, участвующими в реорганизации хроматина [245, 251]. Изучение молекулярных мишеней *MYC*-онкогенов привело к таргетному их ингибированию, которое основано на ассоциации экспрессии онкогена с активностью теломеразы, включающей использование теломестатина, ретиноида ST1926, а также бессмысловых нуклеотидов и малых интерферирующих РНК, образующих гетеродуплексы с молекулой ДНК и тормозящие ее репликацию [245, 252].

Регуляторное влияние *MYC*-онкогенов распространяется на многие сигнальные каскады и процессы: некроз, апоптоз, пролиферацию, репликацию ДНК и вхождение в S фазу клеточного цикла, генетическую лабильность, сочетающуюся с гетеро-, тетраплоидностью, анаплазией, активность теломеразы, адгезию и ангиогенез опухолей при ингибировании их дифференцировки [39, 248]. Столь разнообразные механизмы обуславливают распространение регуляторных влияний онкогенов более чем на 15% генома человека [248].

Дискуссионными остаются вопросы об участии *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов в апоптозе и дифференцировке клеток МБ, которые запускаются NGF и его рецепторами TrkA, p75. Одни авторы предполагают, что ингибирование транскрипционной активности онкогенов по p53-независимому пути через связывание с белком-супрессором опухолей ауксин-реагирующим фактором (ARF) может способствовать апоптозу [253]. Другие исследователи [55, 235] считают, что данный эффект происходит с участием транскрипционного фактора E2F-1, гена, ингибирующего *MYCC*-связывающий интегратор-1 (*BINI*) и p53 белка [223]. Механизм действия *MYCN*-онкогена на дифференцировку клеток МБ и нейробластомы до настоящего

времени не изучен. Известно, что в нем участвует МАРК и, возможно, протеинкиназа В/АКТ – наиболее значимый медиатор клеточной устойчивости [40]. При активации Ras/АКТ каскада наблюдается ингибирование *MYCC*–индуцируемого апоптоза [118].

Противоречива информация о наличии ассоциации *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов с экспрессией p75 рецептора. Установлена корреляция экспрессии p75 рецептора с метастазированием и инвазией нейробластом, МБ и ГБ [39, 232, 254, 255]. Фосфопротеины *MYCC*-, *MYCN*-транскрипционно активируют ген фактора-7, ассоциируемого с циклом деления клеток *CDC47L* (*JPO2*), одноименный белок которого участвует в вышеназванных процессах, тогда как экспрессия гена ингибируется через p75 рецептор [256]. Данный рецептор стимулирует адгезию нейронов через индукцию молекул адгезии нервных клеток (NCAM-1), WNT/ β -кадгеринный путь, регулируемый *MYCC* [257]. Очень скромные данные, относительно чувствительности клеток МБ с *MYCC*-амплификацией к химиопрепаратам. Они освещены в работах единственного автора [39, 258]. В статье [258] показано, что ингибирование *MYCC*-экспрессии интерферирующими РНК снижает чувствительность клеток DAOY, D341, D425 МБ к CSP и этопозиду, подавляя их апоптоз через ингибирование расщепления и активации каспазы-9 [258]. Во второй статье показано, что потенцирование *MYCC*-экспрессии усиливает чувствительность клеток DAOY и UW228 МБ к CSP, карбоплатину, этопозиду, доксорубицину, метотрексату и винкристину [39]. Авторами установлено, что клоны DAOY приостанавливают прохождение цикла в S-фазе после 48 ч экспозиции с CSP и в G₂/M – после обработки этопозидом и доксорубицином.

1.5.4. Клеточные эффекты интерлейкина-6

Известно, что IL-6 стимулирует прогрессию раковых клеток, ангиогенез, инвазию, миграцию [259], метастазирование и изменяет чувствительность к химиопрепаратам [41, 260, 261, 262]. Последняя остается не изученной в отношении опухолей мозга. Действие IL-6 коррелирует с химиорезистентностью клеток множественной лейкемии, карциномы почки, рака предстательной, молочной желез, желудка, легкого к CSP, паклитакселу и доксорубицину и снижением протеолитической активности каспазы-3 со стимуляцией экспрессии белков-ингибиторов апоптоза: Bcl-2, Bcl-XL, XIAP [41] и активацией ядерного фактора транскрипции NF- κ B [41, 261]. Также установлено, что экспрессия гликопротеина P-gp усиливает трансмембранный перенос цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ), приводящих к изменению чувствительности опухолевых клетках к ростовым факторам [263]. В литературе отсутствуют данные о влиянии NGF на секрецию IL-6 клетками интракраниальных опухолей. Нерешенные моменты явились основанием для проведения автором данного рода исследований.

1.6. Потенциальные возможности клинического применения фактора роста нервов и кателицидина LL-37 в качестве лекарственных препаратов

1.6.1. Потенциальные возможности клинического применения фактора роста нервов

Клиническое применение с терапевтической целью ростовых факторов и, в частности NGF, сталкивается с проблемой их доставки через ГЭБ к интракраниальным опухолям. На сегодняшний день нет однозначного мнения о проницаемости ГЭБ для ростовых факторов. Одни авторы [79, 264, 265] утверждают о его проницаемости для NGF, ссылаясь на деструкцию барьера при опухолевом процессе [49], другие [71] – констатируют его проницаемость только соединениями с молекулярной массой менее 700 Да. В связи с этим, следует оговорить возможные пути преодоления этой проблемы. Перспективной оказалась стратегия депонирования ростовых факторов или химиопрепаратов на биodeградебельных полимерах, например, фактора пигментного эпителия (PEDF) на хитозан гидрогеле [100], CSP на полиэтиленгликолях [266], доксорубицина или этопозида на твердых липидных наночастицах трипальмитина [81] с внесением их в ложе опухоли во время нейрохирургической операции (интерстициальная химиотерапия). Данная методика увеличивает выживаемость детей с интракраниальными глиомами в 1,5–2 раза [55]. Возможно, интратекальное введение NGF в ликвор или при помощи тонких катетеров непосредственно внутрь артерий головного мозга [267].

Иной методический прием, связанный с повышением дозы этопозида, заключается во введении его через резервуар типа осмотической помпы Атауата, встроенный в мозг пациента, что приводит к стократному повышению его концентрации в опухоли [92].

Целесообразным представляются интрацеребровентрикулярный и конвекционный методы доставки NGF в опухоль головного мозга, при которых в новообразование или окружающие его ткани помещается катетер, обеспечивающий медленное и постоянное введение препарата. Например, при интрацеребровентрикулярном введении NGF крысам с болезнью Альцгеймера наблюдается усиление пролиферации нейронов в области зубчатой извилины, экспрессии белка синаптических пузырьков – синапсина и синаптогенеза [268]. В другой работе у 3 пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, интрацеребровентрикулярная инфузия 6,6 мг NGF в боковой желудочек проводилась в течение 3 мес. Пациентам были выполнены клинические, нейропсихологические, нейрофизиологические и нейрорадиологические исследования, показавшие незначительные улучшения когнитивных функций [269]. Другие авторы изучали конвекционное высвобождение скорлупой мозга нейротрофического фактора, производимого глиальными клетками (GDNF) у пациентов [270]. Конвекционная химиотерапия начинает широко применяться для лечения глиом головного мозга, что способствует преодолению ГЭБ химиопрепаратами и уменьшает их системные токсические эффекты [271]. Наконец, не

исключается применение индукторов продукции эндогенного NGF: 4-алкилкateхолов (4-метилкateхoла), стимулирующих синтез мРНК NGF в гиппокампе и фронтальной коре крыс; диктиофинов-А и -В, способствующих его образованию в астроцитах [246, 272].

Предпринимаются попытки интраназального введения NGF в мозг пациентам и лабораторным животным [273]. Например, инфузия β -формы рекомбинантного NGF пациентам с болезнью Альцгеймера, спустя 45 мин увеличивает в 2 раза его содержание в обонятельной луковице, коре, мозжечке, стволе мозга, гиппокампе и миндалинах [269]. Аналогичные работы выполнены на крысах при моделировании у них мозговой ишемии посредством окклюзии средней мозговой артерии. Введение NGF крысам через 24 ч после реперфузии на протяжении 6 сут уменьшает пролиферацию клеток, но увеличивает выживаемость вновь образованных нейронов в испилатеральном стриатуме и субветрикулярной зоне [274].

О перспективности применения NGF в клинической практике свидетельствует массовое проведение клинических исследований с целью использования его для терапии окулярных, неврологических, нейродегенеративных заболеваний. Например, в 2015-2017 гг. в больнице Сан-Рафаэле (Милан, Италия) проведено рандомизированное, двойное, слепое контролируемое клиническое исследование по определению терапевтической эффективности применения рекомбинантного NGF человека у 45 пациентов в возрасте 18 лет и старше с пигментным ретинитом, ассоциированным с цистоидным макулярным отеком. Курс лечения состоял 28 сут при применении раствора NGF (180 мкг/мл) в виде глазных капель. Результаты исследования оценивались спустя 1, 3, 6 и 12 мес. [275]. Целью похожего 8-недельного рандомизированного, двойного, слепого, параллельного, контролируемого исследования проведенного в 2017 г. в Пеннском центре сухого глаза при Пенсильванском университете (Филадельфия, Пенсильвания, США), была оценка применения рекомбинантного NGF в виде глазных капель у 150 пациентов (18 лет и старше) с синдромом сухого глаза. При проведении курса терапии, состоящего в использовании NGF (20 мкг/мл) шесть раз в день в течение 8 недель, оценивалась частота нежелательных явлений и уровень матричной металлопептидазы-9 в слезах [276].

Уровень NGF в спинномозговой жидкости коррелирует с тяжестью черепно-мозговой травмы. Причем повышение концентрации NGF коррелирует с лучшим неврологическим статусом пациентов и может служить прогностическим маркером у пациентов с черепно-мозговой травмой [277]. По этой причине в госпитале Цзиньлин при медицинской школе Нанкинского университета (Нанкин, Цзянсу, Китай) в 2010-2017 гг. проведена 2 фаза клинического рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования по оценке терапевтической эффективности интраназального 2 недельного введения NGF у 106 пациентов в возрасте 18-65 лет с черепно-мозговой травмой [278].

Известно, что уровни NGF в моче повышены у пациентов с доброкачественной обструкцией предстательной железы, однако, изменения уровней NGF после купирования заболевания еще полностью не исследованы [279]. Была высказана гипотеза о том, что повышенные уровни NGF в моче снижаются после успешного хирургического лечения предстательной железы. На основании данной гипотезы медицинский центр Samsung (г. Сеул, Корея) в 2013-2017 гг. провел клиническое исследование по оценке уровней NGF в моче у 184 пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы и сравнению их между пациентами с гиперактивностью детрузора и без гиперактивности детрузора через 3 и 6 мес. после медикаментозного или хирургического лечения (трансуретральной простатэктомии). Установлено что, измерение уровней NGF в моче может быть маркером для оценки эффективности терапевтических процедур [280].

Лучевой некроз головного мозга является серьезным осложнением лучевой терапии рака, в том числе опухолей мозга. В 2009-2012 гг. Шанхайский раковый центр совместно с университетом Фудань (Шанхай, Китай) провели клинические исследования по определению эффективности NGF терапии лучевого некроза головного мозга у 30 пациентов (в возрасте 18-70 лет). Эффективность лечения оценивали по результатам магнитно-резонансной томографии (МРТ), выполненной до и после терапевтических процедур. Результаты исследования показали, что NGF терапия может быть успешной при GМ1 стадии лучевого некроза головного мозга [281].

Интерес представляет проводимая в настоящее время (2019-2021 гг.) в Тонгренской Пекинской больнице 1 фаза рандомизированного двойного слепого, плацебо-контролируемого, однократного/многократного исследования по оценке применения рекомбинантного NGF у 86 здоровых добровольцев в возрасте 18-45 лет с индексом массы тела в пределах 19-24 кг /м². Добровольцам вводят препарат NGF внутримышечно в дозах 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 90 мг однократно или многократно. Основная цель исследования – изучить безопасность, переносимость, фармакокинетику и иммуногенность препарата NGF у здоровых добровольцев, чтобы определить безопасный диапазон доз для последующих клинических испытаний [282].

Результаты большинства клинических исследований в настоящее время еще не опубликованы, но сам факт их проведения говорит о значимости и перспективности применения NGF в клинике. Данные по применению NGF при окулярных и неврологических заболеваниях суммированы в таблице 1.1.

Клиническое применение NGF при зрительной, неврологической, онкологической, психической патологиях

Заболевание	Путь введения	Источник
Окулярные: катаракта, поражение роговицы, пигментный ретинит, атрофия зрительного нерва, глаукома, дегенерация ганглионарных клеток сетчатки	глазные капли, мазь, примочки интравентральное	[264], [277], [283], [284], [285]
Онкологические: глиомы и невриномы зрительных нервов	глазные капли, мазь, примочки	[285]
Нейродегенеративные: болезнь Альцгеймера, Паркинсона амиотрофический склероз	глазные капли, мазь, примочки	[147], [286]
Неврологические: лобная эпилепсия	глазные капли, мазь, примочки	[287], [288]
Психические: аутизм, синдром Ретта шизофрения	маркер в крови	[289], [290], [291]
локальная церебральная ишемия (крысы)	интраназальное	[274]
Травмы головного мозга (крысы)	интраназальное	[292]
Диабетическая полинейропатия	подкожно	[293]

1.6.2. Потенциальные возможности клинического применения кателицидина LL-37

Поскольку LL-37 обладает активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов, вирусов и грибов, проводятся исследования по его клиническому применению у пациентов с инфекционными заболеваниями. Пептид LL-37 продуцируется резидентными уроэпителиальными и эпителиальными клетками канальцев почек, а также нейтрофилами [294]. Babikir I.H. с соавторами (2018) провели клиническое исследование типа случай-контроль в 2014-2017 гг. на базе больницы Омдурман (Судан) по изучению уровней LL-37 в плазме и моче методом ИФА у 87 пациентов с инфекциями мочевыводящих путей (ИМП). В опытной группе по сравнению с контролем наблюдалось повышение уровня LL-37 в плазме (2,1 против 1,8 нг/мл, $p=0,002$) и в моче (0,9 против 0,0 нг/мг, $p<0,001$) [295]. Также было установлено, что уровень LL-37 увеличивается с тяжестью ИМП. Обычно уровень hCAP18 в плазме составляет 1,2 мкг/мл, а его значительное количество связано с липопротеинами [167]. Babikir I.H. считают, что оценка уровня LL-37 может использоваться в качестве маркера для дифференциальной диагностики легких и тяжелых форм пациентов с ИМП [295]. При цистите

или пиелонефрите концентрация LL-37 может увеличиваться в восемь раз. LL-37 в концентрации 30 мкг/мл (МИК 8 мкМ) эффективно уничтожает урогенитальную *E. coli* в изолятах, полученных от пациентов с инфекций нижних мочевых путей [294]. Высокие уровни hCAP18 в плазме крови снижают в 3,7 раза риск летальности в течение года от инфекций у пациентов после диализа почек [296]. LL-37 оказался эффективным в экспериментальной модели туберкулеза легких у мышей, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* ($2,5 \times 10^5$ КОЕ). Мышам проводили интратрахеальную ингаляцию LL-37 (три раза в неделю в дозе 1 мг/кг) спустя 60 сут после бактериального заражения. Ингаляция LL-37 приводила к 3–10 кратному снижению бактериальной нагрузки в легких после 28–30 сут лечения [297]. LL-37 защищает эпителий дыхательных путей, проявляя прямую антимикробную активность [298]. Вместе с тем, концентрации LL-37 повышаются при системной или легочной инфекции [299].

Известно, что бутират и витамин D₃ являются мощными индукторами LL-37 [300]. В 2010–2020 гг. Бригам и Бостонский женский госпиталь (штат Массачусетс, США) провели рандомизированное клиническое исследование на 25875 мужчинах и женщинах в возрасте старше 50 лет по оценке эффективности применения витамина D₃ и омега-3 жирных кислот при риске развития урогенитальных и инфекций верхних и нижних дыхательных путей. Участники ежедневно принимали добавки витамина D₃ (холекальциферол, 2000 МЕ) или омега-3 жирных кислот (рыбий жир Omacor® 1 капсула, 1 грамм в день). Кроме того, изучалось влияние этих препаратов на уровни hCAP-18 в плазме пациентов. Применение добавок витамина D₃ или омега-3 жирных кислот снижает риск развития рака, сердечных заболеваний и инсульта у людей, которые ранее не страдали этими заболеваниями [301].

LL-37 может использоваться при терапии сепсиса, вызванного бактериальной инвазией в кровеносное русло [302]. На мышинной модели нейтропенического сепсиса показано, что комбинированное введение LL-37 с G-CSF проявляет наибольшую эффективность в отношении снижения роста бактерий и летальности животных [303]. В другом исследовании, выполненном на внутрибрюшинной модели септической инфекции у крыс, однократное системное введение LL-37 (1 мг/кг) продемонстрировало протекторное действие против летальной бактериемии, вызванной *E. coli* [302].

LL-37 дозо-зависимым образом проявляет противовирусную активность в отношении различных штаммов вируса гриппа А. Предполагается, что он напрямую взаимодействует с вирусом, вызывая разрушение его оболочки [304]. Однако, противовирусный эффект LL-37 снижается в присутствии сыворотки человека в результате связывания пептида с липопротеинами высокой плотности [304]. Barlow с соавторами (2011) показали, что LL-37, инъецированный за 1 сут до и в течение 7 сут после заражения животных гриппом А (H1N1), обеспечивает их защиту от летального исхода за счет повышения выживаемости и

предотвращения потеря веса [305]. Currie с соавторами показали противовирусную эффективность интраназальной инфузии LL-37 (10 мкг/животное) в мышинной модели легочной RSV-инфекции, вызванной введением $5,6 \times 10^5$ БОЕ RSV. LL-37 проявлял протекторный эффект в отношении потери веса и вирусной нагрузки [306].

Также проводятся исследования по применению LL-37 для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний. У пациентов с розацеа (угревой сырью) наблюдается повышенный уровень LL-37 по сравнению с лицами без данной патологии (контрольная группа). Считается, что LL-37 является этиологическим фактором для всех подтипов розацеа [307]. В 2016-2019 гг. Калифорнийский университет (Сан-Диего, США) провел I, II фазы открытого клинического 16-недельного исследования по оценке эффективности 1%-го крема с ивермектином при местном применении и влиянии на экспрессию мРНК LL-37 при розацеа. У пациентов также оценивались клинические симптомы покраснения лица и количество папул на лице. Изменение экспрессии LL-37 определяли в зависимости от продолжительности и тяжести заболевания [308]. Считается, что LL-37 вместе с другими антимикробными пептидами участвует в патогенезе псориаза. При данном заболевании поврежденные кератиноциты высвобождают LL-37, который формирует комплексы с ДНК или РНК, стимулирующие дендритные клетки к продукции IFN- α , IFN- β и дифференцировки Т-клеток [309]. Таким образом, LL-37 в псориазическом очаге кожи превращает инертную собственную ДНК в «сигнал опасности», способствуя локальному Т-клеточному аутоиммунному воспалению, усугубляющему повреждение кожи [208]. Однако, повышенный уровень LL-37 у двух третей пациентов с псориазом средней и тяжелой степени препятствует развитию кожных инфекций, вызванных золотистым стафилококком *Staphylococcus aureus* [309, 310].

Ученые из центра молекулярной медицины при больнице Каролинского университета (Лондон, Великобритания) изучили уровень экспрессии LL-37 в образцах атеросклеротических бляшек, полученных от 25 пациентов, перенесших каротидную эндартерэктомию. В качестве контроля использовали здоровые внутренние артерии почек и молочных желез от 19 пациентов, перенесших соответственно операции по коронарному шунтированию и нефрэктомию. Методом ПЦР установлено, что экспрессия LL-37 и его предшественника CAMP-18 в макрофагах и эндотелиальных клетках в 6 раз увеличена в атеросклеротических сосудах по сравнению со здоровыми артериями. Пептид индуцирует экспрессию молекул межклеточной адгезии (ICAM-1) и моноцитарного хемотаксического фактора-1 (MCP-1) в эндотелиальных клетках, что усиливает неоваскуляризацию и повышает врожденный иммунитет при атеросклерозе [311]. На мышинной модели артериосклероза CAMP способствовал развитию ишемической болезни сердца через рекрутирование моноцитов [312]. В другом исследовании, проведенном на C57BL/6 мышах с дефицитом ортолога человеческого FPR2/ALX Fpr2/3 было

изучено влияние LL-37 на реактивность тромбоцитов, гемостаз и тромбоз. Показано, что при действии LL-37 наблюдается мобилизация кальция, агрегация тромбоцитов, усиливается образование тромбов и сокращается время кровотечения из хвоста у мышей. При применении фармакологического ингибитора FPR2 /ALX эти эффекты подавлялись в тромбоцитах у Fpr2/3 мышей, подтверждая действие LL-37 на тромбоциты через этот рецептор. Роль LL-37 в модуляции тромбоза и гемостаза позволяет рассматривать его в качестве потенциального лекарственного препарата при терапии тромбоцит-ассоциированных осложнений и иммунных ответов [313].

На сегодняшний день проводятся клинические исследования по использованию LL-37 для лечения труднозаживающих ран у пациентов с венозной трофической язвой голени. Например, Индонезийский университет в 2019-2020 гг провел 2 фазу рандомизированного контролируемого клинического исследования по оценке эффективности применения крема на основе LL-37 (0,5 мг /мл) для лечения у 40 пациентов язвы диабетической стопы. Пациенты опытной группы 2 раза в неделю в течение 4 недель применяли крем на основе LL-37 в дополнение к стандартному уходу за раной. Результаты оценивались по скорости заживления раны, измеряемой по ее площади и индексу грануляции, изменению концентраций ИЛ-1 α и TNF- α в жидкости, собранной из раны на 2-3 неделе исследования по сравнению с исходным уровнем [314]. Таким образом, применение LL-37 для терапии хронических инфицированных ран и тромбовоспалительных заболеваний начинает изучаться в клинике, что позволит разработать новые и эффективные препараты на его основе для лечения этих патологических состояний.

Кроме того, уровни LL-37 изменяются при некоторых психических заболеваниях. Например, польские исследователи Wysokinski A. с коллегами (2019) провели исследование по оценке уровней LL-37 у 36 взрослых пациентов с эутимическим биполярным расстройством у 68 взрослых здоровых людей без депрессии в качестве контрольной группы. Концентрацию LL-37 в сыворотке крови оценивали методом ИФА. В опытной группе наблюдалось увеличение уровня LL-37 ($4,97 \pm 7,98$ нг /мл $p=0,01$) по сравнению с контролем ($1,78 \pm 2,69$ нг/мл) [315].

В настоящее время (2015-2021 гг) раковый центр Андерсона совместно с Институтом рака США проводят I и II фазы клинического исследования по оценке безопасности и эффективности дозы LL-37 у 4 пациентов с меланомой. LL-37 вводят еженедельно, внутрь опухоли (начальная доза 250 мкг/опухоль) в кожные или подкожные опухоли диаметром не менее 1 см в течение 8 недель. Целью исследования является определение токсичности биологической дозы LL-37 на протяжении 4 недель. Эффективность оценивается по увеличению минимум в 2 раза экспрессии IFN- α в обработанном участке опухоли спустя 24 ч после инъекции LL-37 [316].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Реагенты

В работе использовали:

- коммерческий препарат кателицидина LL-37 человека (Anaspec, США);
- протегрин-1 (PG-1) свиньи (SynPer, США);
- β -форму рекомбинантного NGF человека (Sigma-Aldrich, США);
- 7S-форму мышинового NGF (Sigma Aldrich, США);
- веро-винкристин (ООО «Верофарм», РФ, раствор для внутривенного введения 0,5 мг/мл, флакон 1 мг/2 мл);
- сульфат гентамицина (раствор для внутривенного и внутримышечного введения 40 мг/мл, Shandong Weifang Pharmaceutical Factory Co., КНР);
- доксорубин-ЛЭНС® (РФ, раствор для внутрисосудистого введения 2 мг/мл, флаконы 10 мг/5 мл);
- карбоплатин-ЛЭНС® (РФ, концентрат для приготовления раствора для инфузий 10 мг/мл, флакон 50 мг/5 мл);
- метотрексат-Эбеве (Ebewe Pharma, Австрия, 1 мл раствора для инъекций 10 мг; во флаконе по 5 мл);
- темозоломид (темодал капсулы 100мг, Орион Корпорейшн Орион Фарма Финляндия);
- циклофосфамид (циклофосфан, ОАО Биохимик, РФ, порошок для приготовления раствора для внутривенного, внутримышечного введения, флакон 200мг);
- цисплатин-ЛЭНС® (РФ, раствор 0,5 мг/мл во флаконе 50 мл);
- цитарабин-ЛЭНС® (РФ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг);
- этопозид-Эбеве (Ebewe Pharma, Австрия, 20 мг/мл, раствор для инфузий 10 мл).

2.1.2. Клетки

В работе использовали:

- клетки глиомы С6 крысы (получены из Российской коллекции клеточных культур, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург);
- клеток глиомы U251 человека (получены из Российской коллекции клеточных культур, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург);
- клетки интракраниальных опухолей получены с информированного согласия родителей у 98 пациентов детского возраста (3 мес–17 лет), находившихся на лечении в Городской клинической больнице скорой медицинской помощи г. Минска в 2008–2013 гг. (договор о

научном сотрудничестве от 21.11.2008 г.) и отделения нейрохирургии для детей № 7 ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, договор о научном сотрудничестве № 424-2019-4/009 от 21.05.2019 г.).

- клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга человека получены от 10 скоропостижно умерших (по причине не связанной с травмами или заболеваниями головного мозга) человек в 2009 г. в результате вскрытия в морге Управления судебно-медицинских экспертиз Государственного комитета судебно-медицинских экспертиз Республики Беларусь по Минской области (письмо Института физиологии НАН Беларуси от 10.02.2009 № 300-01-01/159).

2.2. Группы исследования

С целью формирования клинически относительно однородных групп пациентов из историй болезней получали сведения о гистологическом типе, степени злокачественности, локализации опухоли в головном мозге, степени радикального хирургического вмешательства, а также о возрасте и поле пациентов. Сведения позволили сформировать пять исследовательских групп. В первую группу вошли 42 пациента с ПА (GrI, 22 мальчика и 20 девочек, медиана возраста $7,9 \pm 0,7$ года, $n=42$, приложение 1, таблица 1.1). Вторая группа включала 9 пациентов с АА (GrIII, 5 мальчиков и 4 девочки, медиана возраста $8,6 \pm 1,6$ года, $n=9$, приложение 1, таблица 1.2). Третья группа включала 9 пациентов с ГБ (GrIV, 9 мальчиков, медиана возраста $10,3 \pm 1,9$ года, $n=9$, приложение 1, таблица 1.3). Четвертая группа состояла из 38 детей с МБ (GrIV, 27 мальчиков и 11 девочек, медиана возраста $5,7 \pm 0,6$ года, $n=38$, приложение 1, таблица 1.4). В пятую группу вошли 10 скоропостижно умерших человек, у которых во время вскрытия были взяты фрагменты мозга (8 мужчин и 2 женщины, медиана возраста $57,1 \pm 4,0$ лет, $n=10$, приложение 1, таблица 1.9). В работе использована классификация опухолей ЦНС, принятая Всемирной организацией здравоохранения в 2007 г. [317].

Исследование одобрено локальным этическим комитетом при Институте экспериментальной медицины заключение № 6/20 от 21.10.2020 г.

Отдельную группу составили линии клеток глиомы С6 и U251 ($n=3092$). Общее количество посевов $n=10389$, аликвот – 1020 и 417 электроннограмм.

2.3. Дизайн исследования

Дизайн исследования включает 7 этапов, каждый из которых был подчинен конкретной цели, выполнен на определенном количестве пациентов, посевов и с помощью адекватных методов (таблица 2.1). В работе использованы химиопрепараты: CSP, карбоплатин, цитарабин, этопозид, циклофосфамид, винкристин, доксорубицин, включенные в протоколы CNS grade 3–4 и TMZ, метотрексат, включенные в протокол HIT-GBM-D, применяемые для лечения пациентов, страдающих МБ и глиальными опухолями соответственно [8, 10, 12].

Дизайн исследования

Этап исследования	Задача	Тип опухоли	Метод
Противоопухолевая цитотоксическая активность комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами	Изучить цитотоксическое действие комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами	Глиомы C6, U251, ПА, АА, ГБ, МБ,	МТТ тест, тест с трипановым синим
Действие комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами	Изучить эффекты комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами	Глиомы C6, U251	МТТ тест, тест с трипановым синим
Индивидуальная чувствительность <i>in vitro</i> клеток опухолей пациентов к химиопрепаратам и NGF	Изучить индивидуальную чувствительность клеток опухолей пациентов к химиопрепаратам и NGF	ПА, АА, ГБ, МБ	МТТ тест, тест с трипановым синим
Активность NGF и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки нейроглиальной ткани мозга	Изучить протекторное действие NGF и его комбинаций с химиопрепаратами	Нейроглиальная ткань мозга человека	Тест с трипановым синим
Типы гибели клеток глиомы при применении комбинации PG-1 с этопозидом	Изучить типы гибели клеток при действии PG-1, этопозида и комбинации PG-1 с этопозидом	Глиома U251	Проточная цитометрия
Выбор наиболее эффективной комбинации NGF + химиопрепараты на основе электронно-микроскопического анализа	Изучить типы гибели клеток опухолей мозга к CSP, TMZ, NGF и комбинациям NGF с CSP или TMZ	ПА, МБ	Электронная микроскопия
IL-6 – маркер злокачественности и химиорезистентности клеток опухолей мозга	Изучить секрецию IL-6 при действии химиопрепаратов и NGF, взаимосвязь с химиорезистентностью и агрессивностью опухолей	ПА, АА, ГБ, МБ, эпендимома	Иммуноферментный анализ
Рецепторы TrkA, p75, их соотношение – маркеры химиочувствительности опухолей	Изучить экспрессию рецепторов, их соотношение, взаимосвязь с чувствительностью клеток к комбинациям NGF с CSP и TMZ	АА, ГБ, МБ	Иммунофлуоресценция
MYC, MYCN-онкогены – маркеры чувствительности МБ к NGF	изучить количество копий онкогенов при применении NGF, установить взаимосвязь с чувствительностью МБ к NGF	МБ	i-FISH анализ

На первом этапе изучали цитотоксическое действие NGF, PG-1 и LL-37 на клетки глиом C6, U251, ПА, АА, ГБ и МБ. Также на этом этапе определяли индивидуальную чувствительность клеток опухолей пациентов (ПА, АА, ГБ и МБ) к химиопрепаратам и NGF. Данный этап включал шесть серий опытов, в каждой из которых оценивали чувствительность клеток определенного типа опухоли к каждому из химиопрепаратов. К сериям были отнесены опыты, выполненные на клетках C6, U251, ПА, АА, ГБ, МБ (таблица 2.2).

Таблица 2.2

Количество пациентов и посевов при действии химиопрепаратов, NGF, PG-1 и LL-37

Тип опухолевой ткани	Количество пациентов и посевов				
	пациенты	посевы в контроле	посевы, обработанные химиопрепаратами	посевы, обработанные NGF, PG-1 и LL-37	общее количество посевов
Глиома С6	–	194,0	629,0	343,0	1166,0
Глиома U251	–	137,0	234,0	138,0	509,0
Пилоцитарная астроцитома	42	150,0	1122,0	150,0	1422,0
Анапластическая астроцитома	9	40,0	294,0	40,0	374,0
Глиобластома	9	39,0	287,0	39,0	365,0
Медуллобластома	38	143,0	1069,0	143,0	1355,0
Всего	98	703,0	3635,0	853,0	5191,0

Клетки опухолей оставляли в качестве контрольных, куда не добавляли реагенты. Подсерия включала изучение действия одного из реагентов на клетки от конкретного пациента или клеточную линию, то есть 10 подсерий на каждого пациента (8 химиопрепаратов, NGF и контроль). Каждая подсерия включала от трех до пяти посевов, в зависимости от размера биологического материала. В общем, этап включал: 6 серий, 1080 подсерий, 98 пациентов и 5191 посевов. Активность PG-1 и LL-37 изучали только в отношении клеток глиом С6 и U251.

На втором этапе оценивали цитотоксическое действие комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами на клетках глиом С6, U251 и ПА, АА, ГБ и МБ. Также на этом этапе определяли эффекты комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами на клетках глиом С6 и U251 (таблица 2.3).

Таблица 2.3

Количество пациентов и посевов при действии комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами

Тип опухолевой ткани	Количество пациентов и посевов			
	пациенты	посевы в контроле	посевы, при действии комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами	общее количество посевов
Глиома С6	-	194,0	582,0	776,0
Глиома U251	-	137,0	504,0	641,0
Пилоцитарная астроцитома	22	85,0	645,0	730,0
Анапластическая астроцитома	8	27,0	196,0	223,0
Глиобластома	8	26,0	192,0	218,0
Медуллобластома	22	84,0	632,0	716,0
Всего	60	553,0	2751,0	3304,0

Этап включал 6 серий на клетках глиом С6, U251, ПА, АА, ГБ и МБ. Клетки опухолей оставляли в качестве контрольных, куда не добавляли реагенты. Количество подсерий 9 (для опухоли от каждого пациента). Все подсерии включали от трех до пяти посевов, в зависимости от размера полученного биологического материала. Комбинированное действие PG-1 и LL-37 с

химиопрепаратами изучали только на клетках глиом С6 и U251. В общем, этап включал: 6 серий, 630 подсерий, 60 пациентов с опухолями и 3304 посева.

На третьем этапе изучали протекторное действие NGF, и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки здоровой нейроглиальной ткани мозга человека (таблица 2.4).

Таблица 2.4

Количество трупов и посевов здоровой нейроглиальной ткани при обособленном и комбинированном действии химиопрепаратов и NGF

Тип клеток	Количество трупов и посевов				
	трупы	посевы в контроле	посевы, обработанные NGF и химиопрепаратами	посевы, обработанные комбинациями NGF с химиопрепаратами	общее количество посевов
Здоровая нейроглиальная ткань мозга	10	50,0	450,0	450,0	900,0

Клетки опухолей оставляли в качестве контрольных, куда не добавляли реагенты. Количество подсерий 9 (для клеток от каждого трупа). Все подсерии включали пять посевов. В общем, этап включал: 1 серию, 10 трупов и 900 посевов.

На четверном этапе изучали ультраструктурные особенности типов гибели опухолей в результате действия химиопрепаратов, NGF и его комбинаций с CSP или TMZ (таблица 2.5).

Таблица 2.5

Количество пациентов и электроннограмм при изучении типов гибели клеток в результате действия химиопрепаратов, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами

Тип опухоли	Количество пациентов и электроннограмм						
	пациенты	количество электроннограмм					
		контроль	NGF	CSP	TMZ	NGF + CSP	NGF + TMZ
Пилоцитарная астроцитома	5	52,0	25,0	24,0	25,0	24,0	25,0
Медуллобластома	5	48,0	66,0	29,0	48,0	25,0	26,0
Всего по сериям	10	100,0	91,0	53,0	73,0	49,0	51,0
Всего		417,0					

Этап состоял из двух серий, в каждой из которых изучали типы гибели клеток ПА и МБ при односуточном действии CSP, TMZ, NGF, а также комбинаций NGF + CSP и NGF + TMZ. Клетки указанных опухолей оставляли в качестве контрольных. Количество подсерий 6 для каждого пациента. Каждая подсерия включала от трех до пяти эксплантов, два блока, две сеточки, 10-66 электроннограмм. В общем, этап включал: две серии, 60 подсерий, 10 пациентов и 417 электроннограмм. Кроме того, на этом этапе изучали с помощью проточной цитометрии типы гибели клеток глиомы U251 при односуточном действии PG-1, этопозида и их комбинации. Эта серия включала 36 посевов.

На пятом этапе исследовали изменение секреции IL-6 клетками ПА, АА, эпендимомы, ГБ и МБ при односуточном действии химиопрепаратов и NGF (таблица 2.6).

Таблица 2.6

Количество пациентов и аликвот, в которых изучена секреция IL-6 при действии химиопрепаратов и NGF

Тип опухолевой ткани	Количество пациентов и посевов				
	пациенты	аликвоты в контроле	аликвоты, обработанные химиопрепаратами	аликвоты, обработанные NGF	общее количество аликвот
Пилоцитарная астроцитома	11	33,0	231,0	33,0	297,0
Эпендимома	5	15,0	105,0	15,0	135,0
Анапластическая астроцитома	6	18,0	132,0	18,0	168,0
Глиобластома	5	15,0	111,0	15,0	141,0
Медуллобластома	10	30,0	219,0	30,0	279,0
Всего	37	111,0	798,0	111,0	1020,0

Эксперименты включали 5 серий, каждая из которых выполнена на клетках определенного типа опухоли. Клетки опухолей оставляли в качестве контрольных, куда не добавляли реагенты. Для клеток конкретного пациента приходилось 10 подсерий. Дополнительно, для корреляционного анализа в исследование включена эпендимома, где на каждого пациента приходилось 9 подсерий (на ПА и эпендимоме влияние TMZ не изучали). Каждая подсерия была представлена 3 аликвотами. В общем, этап включал: 5 серий, 354 подсерии, 37 пациентов и 1020 аликвот.

На шестом этапе определяли экспрессию рецепторов TrkA, p75 и TrkA/p75 на клетках АА, ГБ и МБ в результате применения NGF и его комбинаций с CSP или TMZ. Этап включал 3 серии, в каждой из которых изучали экспрессию обоих рецепторов на клетках АА, ГБ и МБ (таблица 2.7).

Таблица 2.7

Количество пациентов и посевов, где изучена экспрессия и соотношение TrkA, p75 рецепторов при действии NGF и его комбинаций с CSP или TMZ

Тип опухоли,	Количество пациентов и посевов								
	пациенты	посевы в контроле		посевы при действии NGF		посевы при действии NGF+ CSP		посевы при действии NGF+TMZ	
		TrkA	p75	TrkA	p75	TrkA	p75	TrkA	p75
Анапластическая астроцитома	5	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0	29,0
Глиобластома	7	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0
Медуллобластома	7	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Всего по сериям	19	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Всего посевов:		800,0							

Клетки каждой опухоли оставляли в качестве контрольных, куда не добавляли реагенты. Количество подсерий – 4 для каждого пациента (контроль, NGF, NGF + CSP, NGF + TMZ). В

свою очередь каждая подсерия включала две части, в которых изучали экспрессию TrkA или p75 рецепторов. Каждая часть подсерии включала от трех до пяти посевов (в подсерии 6-10 посевов). В общем, этап включал: три серии, 76 подсерий, 152 части, 19 пациентов и 800 посевов. При выполнении этапа определена численность опухолевых клеток, экспрессирующих TrkA и p75 рецепторы, их соотношение TrkA/p75 и установлены корреляционные зависимости между экспрессией TrkA и p75 рецепторов, TrkA/p75 и ИЦ NGF, его комбинаций с CSP или TMZ.

На седьмом этапе изучали изменение числа копий *MYCC* и *MYCN* онкогенов в клетках МБ в результате применения NGF и устанавливали корреляции между числом копий онкогенов и ИЦ NGF (таблица 2.8).

Таблица 2.8

Количество пациентов и посевов МБ, в которых изучена численность копий *MYCC*, *MYCN* онкогенов при действии NGF

Подсерия эксперимента	Количество пациентов и посевов		
	пациенты	<i>MYCC</i> -онкоген	<i>MYCN</i> -онкоген
Контроль	9	27,0	27,0
NGF	9	27,0	27,0
Общее количество посевов	9	54,0	54,0
Всего посевов	108,0		

Этап включал одну серию, выполненную на клетках МБ. Клетки опухоли оставляли в качестве контрольных. Количество подсерий 2, для опухоли от каждого пациента (NGF и контроль). В свою очередь каждая подсерия содержала две части, в которых изучали количество копий *MYCC* и *MYCN*-онкогенов. Каждая подсерия включала не менее трех посевов. Итого, этап включал: одну серию, 18 подсерий, 36 частей, 9 пациентов и 108 посевов.

2.4. Метод культивирования клеток

2.4.1. Культивирование клеток глиом С6 и U251

Клетки глиом крысы С6 и U251 человека культивировали в количестве 500 тыс./мл в чашках Петри (Nunc, Дания) или в 96-луночных планшетах (TPP, Швейцария, 10 тыс./лунку) в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Sigma-Aldrich, USA) и сульфата гентамицина 10^{-4} г/мл (Shandong Weifang Pharmaceutical Factory Co., КНР) в условиях CO₂-инкубатора (Heracell, США, 37°C, 95%-влажность и 5% CO₂) [318] в течение 1-2 сут.

2.4.2. Культивирование клеток интракраниальных опухолей и нормальной нейроглиальной ткани человека

Поступавший из клиники в течение 1 ч операционный опухолевый материал в стерильных условиях ламинарного бокса (Lobconco, США) отмывали от крови, освобождали от

соединительнотканых элементов в растворе Хэнкса (Sigma-Aldrich, США), содержащего 4%-ный сульфат гентамицина и механически измельчали до мелких частиц. Клетки подвергали 10 мин ферментативной обработке смесью 0,25%-го раствора трипсина и 0,02%-го ЭДТА в соотношении 1:3 (Sigma-Aldrich, США) при 37°C. Активность фермента нейтрализовали внесением в чашки Петри с посевами 1 мл ЭТС. Обработанный материал подсчитывали в камере Горяева и переносили в количестве 500 тыс. клеток/мл в чашки Петри с 1 мл среды DMEM, содержащей 10% ЭТС [319].

Клетки нейроглиальной ткани выделяли из мозжечка скоропостижно умерших (по причине не связанной с травмами или заболеваниями головного мозга) людей в течение 24 ч с момента смерти (приложение 1, таблица 1.9), [320]. Время, необходимое для транспортировки биологического материала в лабораторию не превышало 1 ч. В стерильных условиях ламинарного бокса фрагменты ткани трехкратно промывали в растворе Хэнкса с десятикратным содержанием 4%-го раствора сульфата гентамицина, стрептомицина (Киевмедпрепарат, Украина) 100 мкг/мл, натриевой соли пенициллина G (Biochemie, Австрия, 100 ед/мл) в течение 30 мин, механически очищали от видимых кровеносных сосудов и измельчали до мелких частиц, которые подвергали действию 0,25%-го раствора трипсина и 0,02%-го ЭДТА на протяжении 20 мин при 37°C и обрабатывали ДНКазой (Sigma-Aldrich, США) 20 мкг/мл при 37°C в течение 25 мин. Активность ферментов ингибировали, добавляя ЭТС. Обработанный материал центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин и пипетировали. Перед посевом на чашки Петри определяли жизнеспособность клеток на нулевом пассаже, окрашивая их трипановым синим. В исследование брали только те образцы ткани, где жизнеспособность клеток была не менее 75%. Далее клетки подсчитывали в камере Горяева и переносили в количестве 500 тыс./мл в чашки Петри с 1 мл среды DMEM, содержащей 10%-ную ЭТС. Внесение реагентов проводили на стадии логарифмического роста клеток, достижение которой оценивали визуально по резко возросшему количеству митозов и численности клеток с помощью цифровой фотокамеры Altra20, снабженной программным обеспечением Analysis getIT (Olympus, Япония) на инвертированном микроскопе НУ-2Е (Carl Zeiss, Германия) при ув. $\times 312$. Для достижения данной стадии опухолевым, нормальным глиальным клеткам и нейронам требуется различный временной интервал вследствие отличий в скорости адгезии и пролиферации [113, 320]. Клетки интракраниальных опухолей культивировали на протяжении 2 сут [321], а клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга выращивали в течение 28 сут [320] в стандартных условиях (37°C, 95%-ной влажности и 5% парциальном давлении CO₂) [319, 320]. На жизнеспособность клеток, выделяемых из аутопсийных образцов, указывают как собственные результаты автора, так и данные литературы [320, 322]. Например, по оценкам МТТ, окрашивания на кальцеин и зеленым

флуоресцентным красителем нуклеиновых кислот SYTO-10 она составляет 77% и 82,1% соответственно [320]. Наличие и численность жизнеспособных клеток в аутопсийном материале подтверждается выходом их из эксплантов в количествах от 1,17 млн. до 37 млн./г ткани [322]. К 28-м суткам культивирования в посевах, полученных из фрагментов нейроглиальной ткани мозга, определяются следующие типы клеток: астроциты, олигодендроциты, клетки микроглии, нейроны [320, 323, 324] и плюропотентные стволовые клетки [325].

2.5. Подбор концентраций реагентов и их комбинаций

2.5.1. Подбор доз химиопрепаратов при обособленном действии

На клетках ПА, АА, ГБ и МБ, полученных от пациентов, испытывали односуточное действие химиопрепаратов: винкристина, карбоплатина, метотрексата, TMZ, циклофосфамида, цитарабина, CSP и этопозид. Для этой цели химиопрепараты предварительно тестировали в 4-6 концентрациях начиная от разовой дозы при 10-кратном разведении на клетках глиомы С6, подбирая одну оптимальную дозу каждого из химиопрепаратов (поверхность тела ребенка в среднем составляет 1 м^2 (10000 см^2) [109], что в 1000 раз больше площади 35-миллиметровой чашки Петри (с содержанием среды 1 мл) [31]. Для применения на опухолевых клетках онкологических пациентов были выбраны дозы, при которых ИЦ всех химиопрепаратов были наиболее приближены к медиальному значению (ИЦ 50%), а именно: дозы, в 100000 раз уменьшенные по сравнению с разовыми дозами, (рисунок 2.1).

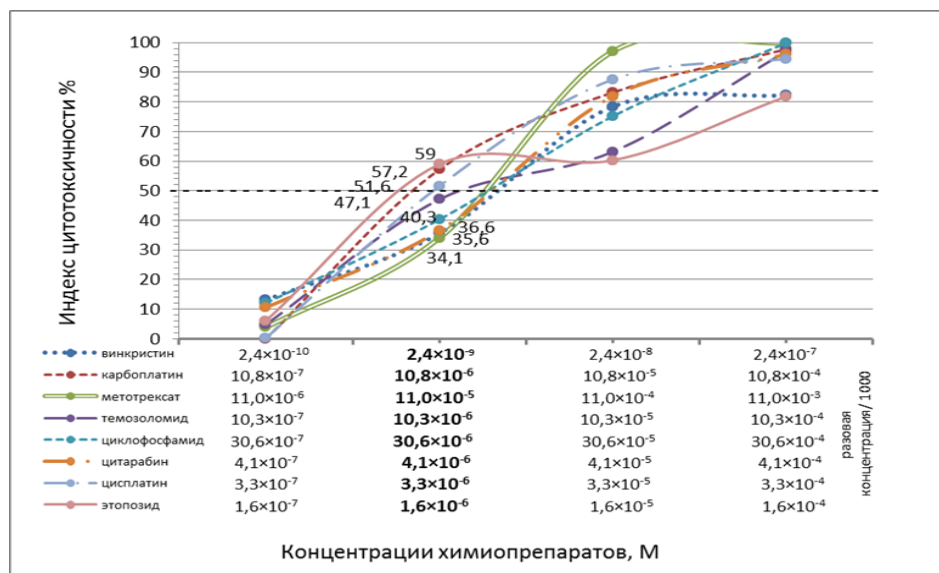


Рисунок 2.1. График зависимости ИЦ винкристина, карбоплатина, метотрексата, темозоломида, циклофосфамида, цитарабина, цисплатина и этопозид от концентраций химиопрепаратов при односуточном действии на клетки глиомы С6

Полученные рабочие концентрации химиопрепаратов были близки к дозам, используемым на клеточных линиях астроцитомы, ГБ, нейробластомы и МБ человека, приведенным в литературе [121] (таблица 2.9).

Соответствие рабочих концентраций химиопрепаратов дозам (ИК₅₀) на клеточных линиях интракраниальных опухолей человека, приведенных в литературе

Химиопрепарат	Концентрация химиопрепарата			Источник
	разовая, М	рабочая, используемая автором, М	клеточные линии опухолей человека (ИК ₅₀) по данным литературы, М	
Винкристин	$2,4 \times 10^{-7}$	$2,42 \times 10^{-9}$	$2,0-3,0 \times 10^{-9}$ $2,0 \pm 0,5 \times 10^{-8}$	Нейробластома: SK-N-BE, Kelly [326]
			$4,2 \times 10^{-9}$	A172 астроцитома [327]
			$1,8 \times 10^{-9}$ $244 \times 10^{-9} - 300 \times 10^{-12}$ $1,0 \times 10^{-8}$	HROG06 ГБ [109], [328], [329]
Карбоплатин	$10,8 \times 10^{-4}$	$10,8 \times 10^{-6}$	$10,0 \times 10^{-6}$	нейробластома, МБ [59]
			$9,8 \times 10^{-6}$ $9,8 - 12,2 \times 10^{-6}$	астроцитома LNZ308 [128]
			$11,8 \times 10^{-6}$	ГБ [63]
Метотрексат	$11,0 \times 10^{-3}$	$11,0 \times 10^{-5}$	$10,0 \times 10^{-5}$	нейробластома, МБ [125]
			$10,0 \times 10^{-5}, 11,0 \times 10^{-5}$	олигоастроцитома [109], [329]
			$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$ $2,2 \times 10^{-8} - 22 \times 10^{-5}$	ГБ: HROG13, HROG10
Темозоломид	$10,3 \times 10^{-4}$	$10,3 \times 10^{-6}$	$10,0 \times 10^{-6}$ $0,01 - 1,5 \times 10^{-3}$	МБ: U W228 [330]
			$10,0 \times 10^{-6}$ $10,0 - 100,0 \times 10^{-6}$ $5,0 - 30,0 \times 10^{-6}$	астроцитома: U87MG MOGGCCM [331], [332]
			10×10^{-6} $10,0 \times 10^{-6}$	ГБ: U118 GBM [109], [329], [333]
Циклофосфамид	$30,6 \times 10^{-4}$	$30,6 \times 10^{-6}$	$35,6 \times 10^{-6}$	МБ: Daou [252]
			$50,8 \times 10^{-6}$ $36,4 \times 10^{-6}$ $20,1 \times 10^{-6}$	астроцитома: L1210, U937, GAMG ГБ [334]
			$4,16 \times 10^{-6}$ $1,5 - 10,0 \times 10^{-6}$ $3,20 \times 10^{-6}$	D54 МБ MED9 [11], [330]
Цисплатин	$3,3 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-6}$ $3,9 \pm 0,4$	U251MG астроцитома SKMG-1 [335]
			$3,6 \times 10^{-6}$ $3,5 \pm 0,44 \times 10^{-6}$ $3,63 \times 10^{-6}$	SF295, T98G SH-SY5Y MED13 МБ [11], [109], [329], [334], [335]
			$3,8 - 6,5 \times 10^{-6}$ $6,5 \times 10^{-6}$ $6,5 \pm 2,07 \times 10$	ГБ HROG24, HROG15 [109], [329]
Этопозид	$1,6 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$1,70 \pm 0,05$ $1,5 \times 10^{-6}$ $1,44 \times 10^{-6}$	SK-N-BE, SK-N-AS SHEP МБ: MED1, [11], [326], [336]
			$1,5 \times 10^{-6}$ $1,7 \times 10^{-6}$	астроцитома LNC [68]

Примечание: в таблице представлены молярные концентрации М (моль/л), являющиеся постоянными и не зависящими от величины площади, на которую наносится исследуемый химиопрепарат

Таким образом, рабочие дозы составили: для винкристина $2,4 \times 10^{-9}$ М (0,02 мкг/мл) [142], карбоплатина $10,8 \times 10^{-6}$ М (4 мкг/мл), метотрексата $11,0 \times 10^{-5}$ М (50 мкг/мл), TMZ $10,3 \times 10^{-6}$ М (2 мкг/мл) [121], циклофосфида $30,6 \times 10^{-6}$ М (8 мкг/мл) [142], CSP $3,3 \times 10^{-6}$ М (1 мкг/мл) [142], цитарабина $4,1 \times 10^{-6}$ М (1 мкг/мл), этопозид $1,6 \times 10^{-6}$ М (1 мкг/мл) [142], (таблица 2.9).

2.5.2. Подбор концентраций фактора роста нервов и химиопрепаратов при комбинированном действии

На клетках глиомы С6 NGF применяли в концентрации $8,8 \times 10^{-9}$ М (0,1 мкг/мл), приведенной в литературе [9]. Для установления концентрации химиопрепаратов, при применении которой ИЦ всех комбинаций был бы максимально приближен к медиальному значению, каждую из приведенных комбинаций тестировали на глиоме С6 в четырех разведениях. При этом доза NGF ($8,8 \times 10^{-9}$ М) оставалась константной, а концентрацию химиопрепарата уменьшали в 10 раз, начиная с рабочей [18] (рисунок 2.2).

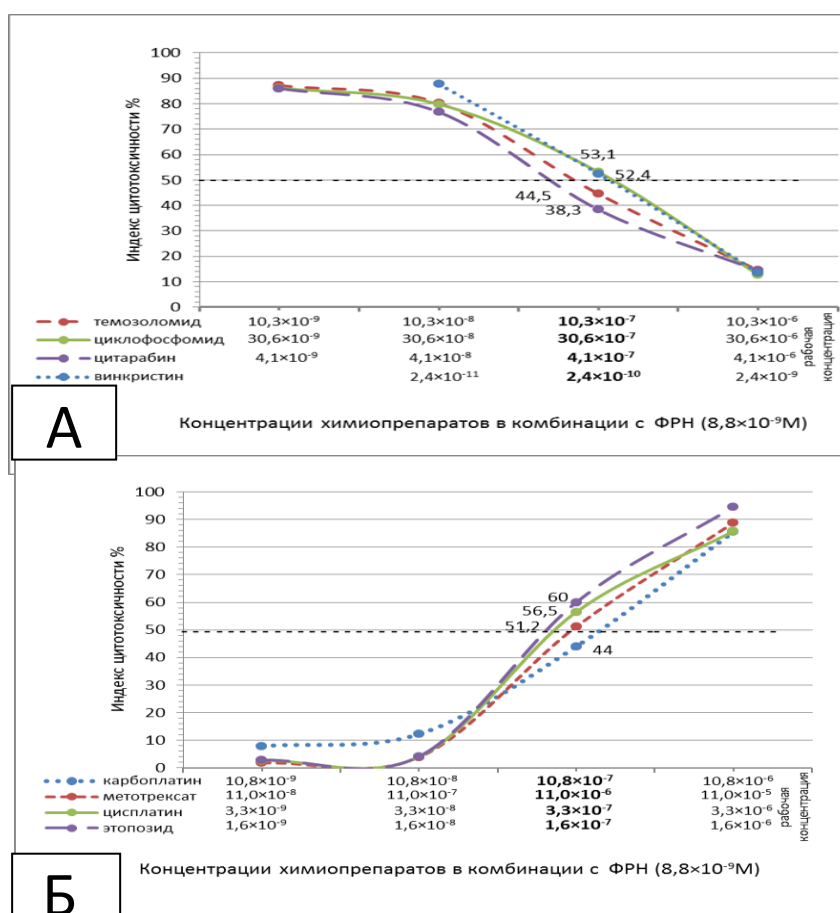


Рисунок 2.2. Графики зависимости концентрации карбоплатина, метотрексата, цисплатина, этопозид (А) и темозоломида, циклофосфида, цитарабина, винкристина (Б) в комбинации с NGF от индекса цитотоксичности при односуточном действии на клетки глиомы С6

Таким образом, получены дозировки химиопрепаратов для применения в комбинации с NGF: концентрация винкристина $2,4 \times 10^{-9}$ М, карбоплатина $10,8 \times 10^{-7}$ М, метотрексата $11,0 \times 10^{-6}$ М, TMZ $10,3 \times 10^{-7}$ М, циклофосфида $30,6 \times 10^{-7}$ М, CSP $3,3 \times 10^{-7}$ М, цитарабина $4,1 \times 10^{-7}$ М и этопозиды $1,6 \times 10^{-7}$ М. При тестировании NGF и его комбинаций с химиопрепаратами в данных дозах на опухолях человека наблюдали разброс в значениях ИЦ среди пациентов, отражающий индивидуальную чувствительность. При тестировании NGF и его комбинаций с химиопрепаратами в данных дозах на опухолях человека наблюдали разброс в значениях ИЦ среди пациентов, отражающий индивидуальную чувствительность.

2.5.3. Подбор доз фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на клетках глиом С6 и U251

Также на клетках глиом С6 и U251 с помощью МТТ и теста с трипановым синим подбирали дозы NGF, PG-1 и LL-37. При этом PG-1 тестировали в дозах 2, 4, 8, 16, 32 и 64 мкМ, а LL-37 – в дозах 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 мкМ (рисунки 2.3, 2.4, 2.5, 2.6). NGF тестировали в дозах 6, 12,5, 25, 50, 100, 200 нМ (рисунки 2.7, 2.8).

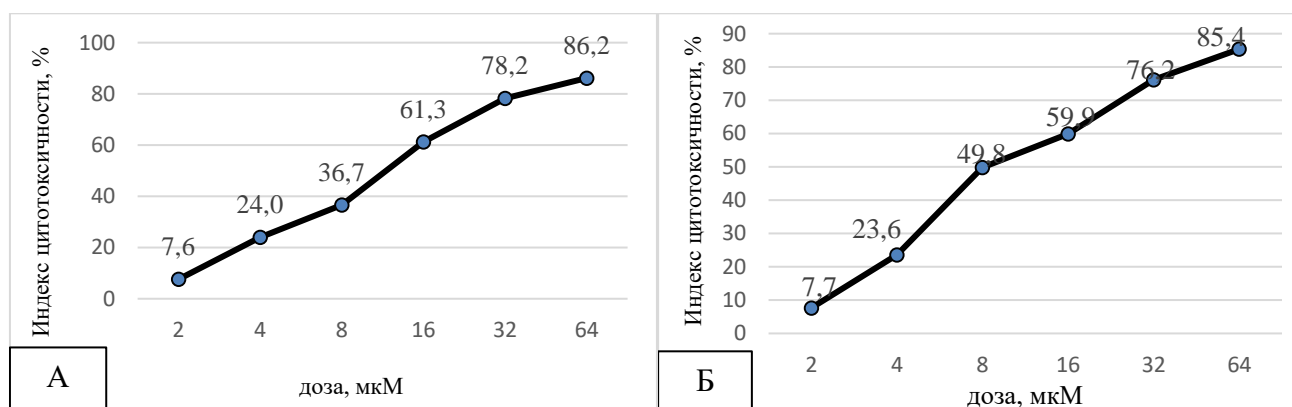


Рисунок 2.3. Графики зависимости ИЦ PG-1 от дозы при односуточном действии на клетки глиомы С6 в МТТ тесте (А) по окрашиванию трипановым синим (Б)

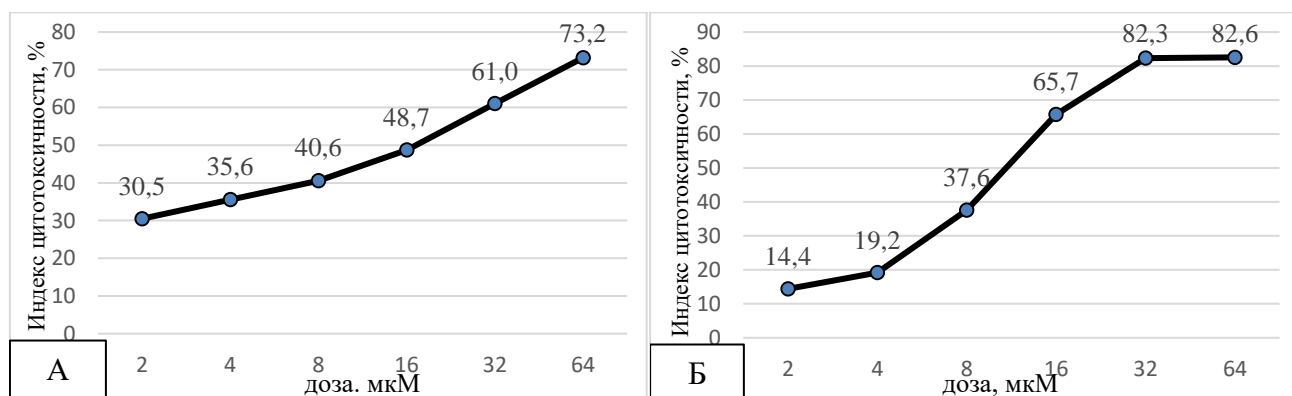


Рисунок 2.4. Графики зависимости ИЦ PG-1 и от дозы при односуточном действии на клетки глиомы U251 в МТТ тесте (А) и по окрашиванию трипановым синим (Б)

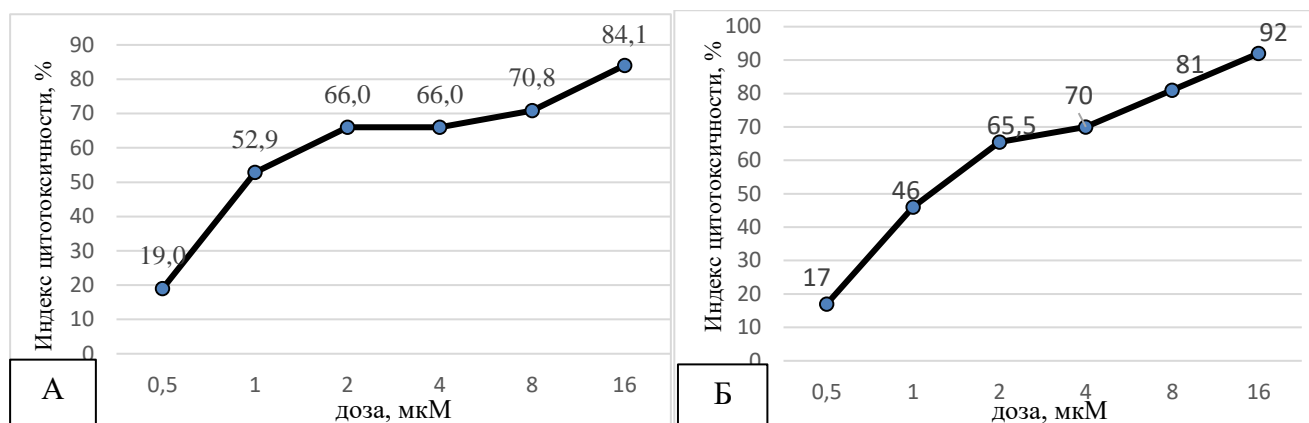


Рисунок 2.5. Графики зависимости ИЦ LL-37 от дозы при односуточном действии на клетки глиомы С6 в МТТ тесте (А) и по окрашиванию трипановым синим (Б)

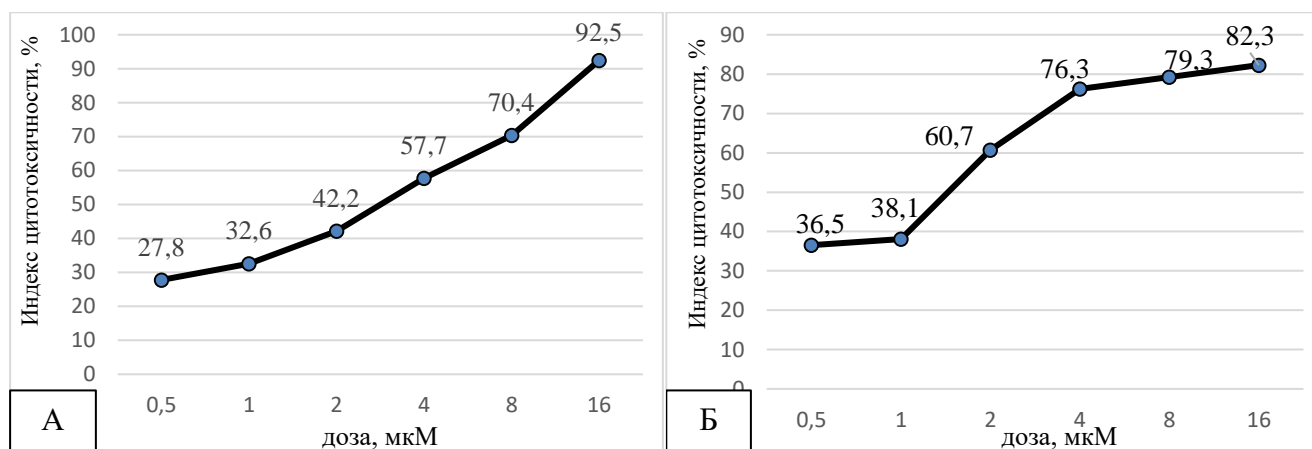


Рисунок 2.6. Графики зависимости ИЦ LL-37 и от дозы при односуточном действии на клетки глиомы U251 в МТТ тесте (А) и по окрашиванию трипановым синим (Б)

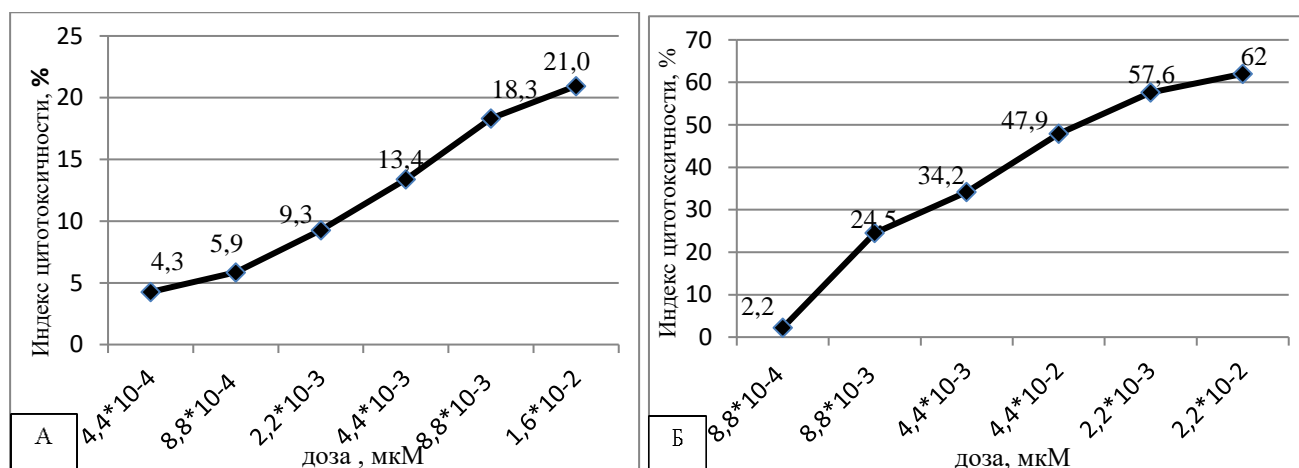


Рисунок 2.7. Графики зависимости ИЦ NGF и от дозы при односуточном действии на клетки глиомы С6 в МТТ тесте (А) и по окрашиванию трипановым синим (Б)

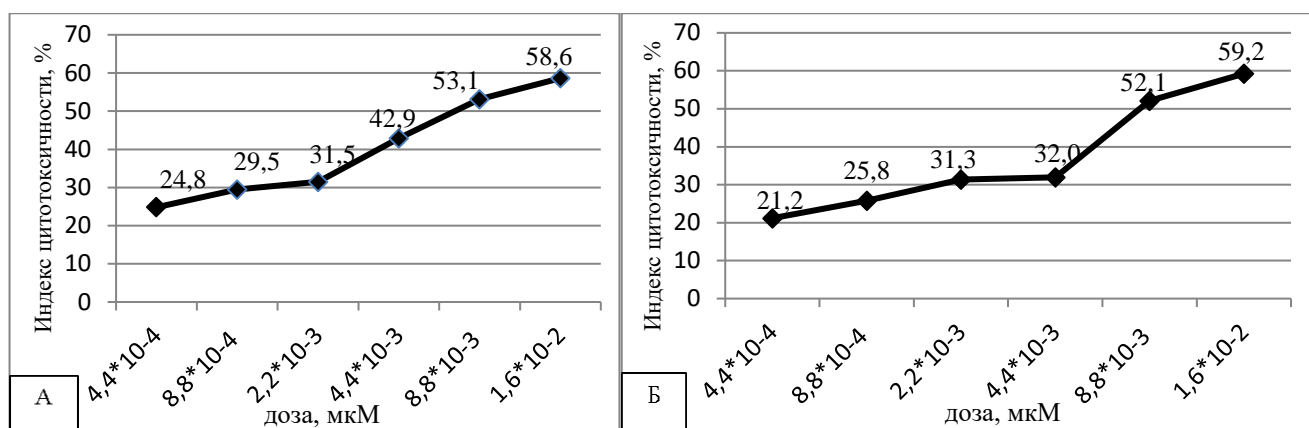


Рисунок 2.8. Графики зависимости ИЦ NGF и от дозы при односуточном действии на клетки глиомы U251 в МТТ тесте (А) и по окрашиванию трипановым синим (Б)

Таким образом, для экспериментов были выбраны дозы NGF, LL-37 и PG-1, при которых наблюдалась 50%-ная гибель клеток: для NGF $8,8 \cdot 10^{-3}$ мкМ, LL-37: 1 и 2 мкМ на глиоме С6 и 3 и 2 мкМ на глиоме U251 соответственно для МТТ и анализа с трипановым синим, для PG-1: 10 и 8 мкМ на глиоме С6 и 20 и 16 мкМ на глиоме U251 соответственно для МТТ и анализа с трипановым синим.

2.6. Оценка цитотоксического действия химиопрепаратов, фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37 на опухолевых и нормальных клетках мозга

2.6.1. Оценка цитотоксической активности соединений с использованием красителя трипанового синего в камере Горяева

Подсчёт в суспензии опухолевых, нормальных клеток мозга и определение цитотоксической активности химиопрепаратов, NGF, PG-1 и LL-37 проводили в камере Горяева (Минимед, РФ) под световым микроскопом (объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$, общее увеличение $\times 100$).

Камера Горяева представляет собой толстое прямоугольное стекло с сеткой на его поверхности (рисунок 2.9).

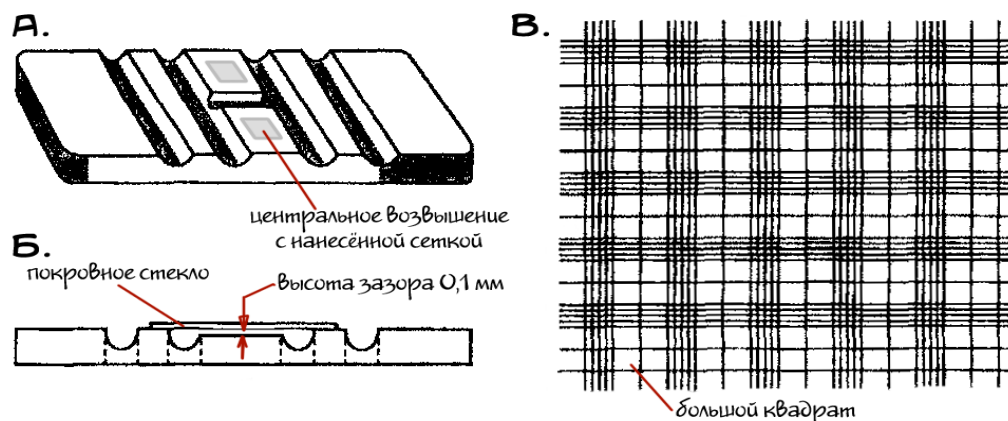


Рисунок 2.9. Камера Горяева

А – вид сверху; Б – вид сбоку; В – сетка камеры [337]

Сетка камеры Горяева образована системой перпендикулярных линий и состоит из 225 больших квадратов со стороной 1/5 мм, площадью 1/25 мм² и объемом 1/250 мм³. Сто больших квадратов не разлинованы, 25 – разделены каждый на 16 малых со стороной 1/20 мм, площадью 1/400 мм² и объемом 1/4000 мм³ [337].

Опухолевые и нормальные клетки мозга подвергали 1 сут. действию химиопрепаратов, NGF, PG-1, LL-37 или их комбинаций, как описано в разделе 2.5.

Перед нанесением клеток, камеру промывали водой и насухо вытирали. На участок камеры, где нанесена сетка, помещали покровное стекло. Для отличия жизнеспособных клеток от погибших, суспензию клеток смешивали с 0,4%-раствором красителя трипанового синего (Alta Aesar, Германия) в соотношении 1:1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем, 20 мкл суспензии клеток помещали между щелью, образованной покровным стеклом и камерой Горяева. После заполнения камеру переносили на предметный столик микроскопа, проводили фокусировку так, чтобы линии сетки были хорошо различимы и подсчитывали количество клеток в 20 больших квадратах, расположенных вдоль диагонали сетки. При подсчете руководствовались правилом Егорова: "Относящимися к данному квадрату считаются клетки, лежащие внутри квадрата, так и на его левой и верхней границе" [338]. Клетки, содержавшие краситель, считали погибшими, без красителя – жизнеспособными. Концентрацию определяли как число клеток в единичном объеме 1 мл = 1 см³. В соответствии с этим, её расчёт производили по формуле 2.1:

$$X = \frac{B}{N \cdot V} \cdot Y = \frac{B}{N} \cdot 250000 \cdot Y \quad (2.1)$$

где X – искомая концентрация клеток/мл; B – число клеток в N больших квадратах; N – число больших квадратов, в которых производили подсчёт; V – объём жидкости над одним большим квадратом в мл ($V=1/250000$ мл); Y – кратность разведения (учитывая первоначальное разведение красителем в 2 раза).

Оценку цитотоксической активности химиопрепаратов, NGF, PG-1 и LL-37 проводили по степени подавления роста опухолевых клеток [18], которую выражали индексом цитотоксичности (ИЦ), рассчитанному по формуле 2.2.

$$N(\%) = \left(\frac{1 - \text{Опыт}}{\text{Контроль}} \right) \times 100 \quad (2.2)$$

где $N\%$ – ИЦ реагентов, опыт – выживаемость клеток при действии химиопрепаратов, NGF, PG-1 и LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами, контроль – выживаемость клеток в контрольных посевах без добавления реагентов [18, 117, 142].

Дополнительно для устранения возможных побочных эффектов средового окружения (трипсин с ЭДТА, трипановый синий и другие) на результаты исследования, анализировали цифровые изображения, полученные при витальной фотосъемке клеток с помощью цифровой фотокамеры Altra20 (Olympus, Япония) и программного обеспечения Analysis getIT, установленных на инвертированном микроскопе НУ-2Е (Carl Zeiss, Германия) при увеличении

× 312,5 и программы ImageJ (версия 1.38r). С каждой чашки Петри делали пять снимков. Общее количество посевов составило n=10389, из них 900 – на клетках нейроглиальной ткани мозга.

2.6.2. Оценка цитотоксического действия соединений с помощью МТТ-теста

Цитотоксичность химиопрепаратов, NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций в отношении клеток глиом С6, U251 оценивали также с помощью МТТ-теста [339, 340]. Для этого в лунки стерильных 96-луночных плоскодонных планшетов вносили разведенных в 50 мкл среды ДМЕМ 10000 клеток/лунку за 1 сут до добавления химиопрепаратов, пептидов и их комбинаций. Концентрацию клеток в суспензии предварительно определяли, как описано в п. 2.5. Приготавливали двукратные серийные разведения NGF, PG-1, LL-37 и 2-10 кратные разведения химиопрепаратов в среде ДМЕМ, после чего вносили по 50 мкл/лунку полученных растворов в лунки планшетов с клетками. Для каждой концентрации реагента делали 3 повтора. В случае исследования комбинированного действия двух веществ, вносили по 25 мкл/лунку каждого из них в соответствующей концентрации. Использовали два вида контролей. При положительном контроле (100% жизнеспособных клеток) вместо реагентов в лунки с опухолевыми клетками вносили 50 мкл среды ДМЕМ. При отрицательном контроле (0% жизнеспособных клеток) в пустые лунки планшета вносили по 100 мкл среды ДМЕМ, имитируя отсутствие живых клеток. Конечный объем проб во всех лунках составлял 100 мкл. Планшеты с пробами инкубировали 1 сут в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C и 5%-ном содержании CO₂. Через 1 сут. в лунки планшета добавляли по 25 мкл раствора МТТ, приготовленного на ФСБ в концентрации 5 мг/мл и инкубировали 3 ч при тех же условиях. По окончании инкубации во все пробы вносили по 50 мкл/лунку изопропанола, содержащего 0,04 н HCl и тщательно перемешивали до полного растворения осадка формазана. Измерение оптической плотности раствора в лунках планшета проводили при длине волны 540 нм, вычитая величину оптической плотности при 690 нм, как фоновую, с помощью планшетного спектрофотометра SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Экспериментальные данные собирали с помощью программы SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices, США).

На основе собранных данных определяли цитотоксичность действующих веществ. Процент погибших клеток рассчитывали на основании сравнения оптической плотности проб с положительным (100% жизнеспособных клеток) и отрицательным (0% жизнеспособных клеток) контролями по формуле 2.3 [117]:

$$\text{ПК (\%)} = \frac{OD(\text{контроль}) - OD(\text{пробы})}{OD(\text{контроль}) - OD(0\% \text{ ЖК})} \times 100\%, \quad (2.3)$$

где, ПК (%) — процент погибших клеток в пробе, OD (пробы) – оптическая плотность пробы, содержащей исследуемый реагент или комбинацию в заданной концентрации; OD (контроль)

— средняя оптическая плотность лунок с интактными клетками; OD (0%ЖК) — средняя оптическая плотность лунок с культуральной средой, не содержащей клеток.

Для контроля сопоставимости результатов МТТ-теста с реальной картиной гибели клеток параллельно проводили подсчёт погибших клеток в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего, как описано в п. 2.6.1.

2.6.3. Оценка по ИК₅₀ цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37 с химиопрепаратами и их эффектов на клетках глиом С6 и U251

На основании полученных эффектов NGF, LL-37 и PG-1 при различных дозах на клетках глиом С6 и U251 с помощью метода нелинейного регрессионного анализа и программы OriginPro 8.5 рассчитывали значения ИК₅₀. Также на основании эффектов и доз рассчитывали ИК₅₀ химиопрепаратов и их комбинаций с NGF, LL-37 и PG-1. ИК₅₀ химиопрепарата в каждой комбинации определяли исходя из фиксированных пропорций, для каждой комбинации в зависимости от показателей ИК₅₀ химиопрепарата по формуле 2.4:

$$\text{ИК}_{50}\text{химиопрепарата} = \text{ИК}_{50}\text{комбинации} \times W \quad (2.4)$$

где W – доля химиопрепарата в комбинации.

Рассчитав ИК₅₀ химиопрепаратов, PG-1, LL-37, NGF и их комбинаций, определяли по формуле 2.5 комбинационный индекс (КИ, CI) и типы эффектов комбинаций (синергизм, антагонизм, аддитивизм) [341].

$$CI = \frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2} \quad (2.5)$$

где CI – комбинационный индекс, D₁ и D₂ – дозы ИК₅₀, веществ 1 и 2, вызывающих гибель клеток при обособленном применении; (Dx)₁ и (Dx)₂ – дозы ИК₅₀ эти веществ в комбинации. ИК₅₀ вещества в комбинации рассчитывали по формуле 2.8.

Аддитивным считали эффект комбинации (ЭК) меньше суммы эффектов комбинантов, но больший эффекта более активного комбинанта:

$$A + B > \text{ЭК}, \text{ но } AB > \text{Э}_{\max}(A \text{ или } B),$$

где A и B – эффекты веществ при обособленном применении. Для аддитивности КИ=1.

Синергетическим считали эффект ЭК меньше суммарного эффекта равных по эффекту комбинантов, но больший, чем эффекты одного из веществ:

$$A \text{ или } B < \text{ЭК}, \text{ но } AB < \text{Э}\Sigma(A + B)$$

Для синергизма КИ<1.

Снижением эффекта (антагонизм) считали ЭК меньше, чем эффект более активного комбинанта:

$$\text{ЭКАВ} < \text{Э}_{\max}(A \text{ или } B)$$

Для антагонизма $KI > 1$.

Для комбинаций, проявляющих синергизм, также был рассчитан по формуле 2.6 индекс снижения дозы (ИСД):

$$ИСД = \frac{(D)1}{(Dx)1} \quad (2.6)$$

2.7. Определение индивидуальной чувствительности клеток интракраниальных опухолей пациентов к химиопрепаратам и фактору роста нервов

С целью определения индивидуальной чувствительности клеток опухолей мозга к химиопрепаратам автором был разработан и использован «способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения астроцитомы (МБ, эпендимомы, атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли, нейробластомы) у ребенка» как вариант «скринингового метода определения лекарственной чувствительности опухолевых заболеваний лимфоидной ткани» [111, 118]. Определение индивидуальной чувствительности клеток опухолей к химиопрепаратам и NGF выполнено с использованием указанного варианта метода на клетках АА (n=9), ГБ (n=9), МБ (n=38), эпендимомы (n=18), примитивной нейроэктодермальной (n=6), атипичной тератоидной/рабдоидной (n=8) опухолей и нейробластомы (n=4). Группа глиальных опухолей включала образцы АА и ГБ; группа эмбриональных опухолей включала образцы МБ, примитивной нейроэктодермальной опухоли (приложение 1, таблица 1.6), атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли (приложение 1, таблица 1.7) и нейробластомы (приложение 1, таблица 1.8). Группа образцов эпендимомы (приложение 1, таблица 1.5). На клетках интракраниальных опухолей тестировали химиопрепараты, используя одну концентрацию каждого из химиопрепаратов, рассчитанную из разовой дозы [110, 111, 122].

Цитотоксический эффект химиопрепаратов на опухолевые клетки сопоставляли с ответом опухолей пациентов на проводимую химиотерапию. Образцы опухолей делили на группы по степени чувствительности к химиопрепаратам *in vitro* с «высокой чувствительностью», «умеренной чувствительностью» и «низкой чувствительностью».

Пациентов, образцы опухолей которых *in vitro* подвергали действию химиопрепаратов, также распределяли по группам в зависимости от эффективности проводимой химиотерапии. С этой целью из историй болезни пациентов брали информацию о степени радикального вмешательства: тотальное (резекция 95% и более объема опухоли), субтотальное (резекция 75–94% объема опухоли), частичное (резекция 50–74% объема опухоли) удаление, биопсия (резекция менее 50% объема опухоли) [66, 98, 141], спектре и концентрациях химиопрепаратов, применявшихся в течение 1–4 курсов химиотерапии на протяжении (3–6 мес), а также заключения, сделанные специалистами по магнитно-резонансной (МРТ) или компьютерной

(КТ) томографиям о положительной или отрицательной динамике объема остаточной опухоли, наличия метастазов, рецидивов в ближайших (спинной, головной мозг) и отдаленных регионах. Результаты МРТ или КТ сопоставляли с данными предыдущих исследований, проведенных после хирургического вмешательства. На основании этих данных пациенты, прошедшие курсы химиотерапии, а также фрагменты их опухолей, протестированные *in vitro*, были распределены по двум основным группам: «ответившие» и «не ответившие» на химиотерапию.

Клетки рассматривали как «ответившие» на химиотерапию при попадании в группы образцов с «высокой» и «умеренной» чувствительностью, и «не ответившие», если образцы были отнесены к группе с «низкой» чувствительностью [342]. Образцы опухолей пациентов считали «ответившими» на терапию при проведении всех форм хирургической резекции опухоли, у которых наблюдали исчезновение, уменьшение или отсутствие увеличения размеров опухоли (реакция сохранившейся ее части) по результатам КТ- или МРТ-исследований при отсутствии диссеминации. Пациентов со всеми формами хирургической резекции опухоли, у которых наблюдали увеличение объема опухоли на 25% и более или возобновление её роста после химиотерапии, наличие очагов метастазирования в соседние отделы головного мозга или в спинной мозг, диффузный, инфильтративный рост по данным визуализации МРТ или КТ [46, 343] считали «не ответившими» на терапию [46].

Терапию пациентов с АА и ГБ проводили согласно протоколам HIT-GBM-D: CSP (карбоплатином), этопозидом и винкристином, HIT-2000: карбоплатином (CSP), этопозидом, циклофосфамидом или винкристином, а также индивидуально TMZ. Химиотерапию пациентов с эпендимомой проводили по протоколу HIT-2000: карбоплатином, метотрексатом, этопозидом, циклофосфамидом и винкристином, отдельным пациентам был назначен CSP. Терапию медуллобластомы проводили согласно протоколу CNS high grade (3-4): карбоплатином, CSP, этопозидом, циклофосфамидом, винкристином, отдельным пациентов лечили TMZ или метотрексатом. Пациентов с примитивной нейроэктодермальной опухолью лечили в соответствии с протоколами CNS high grade (3-4): или Euroewing 99: этопозидом и винкристином. Терапию пациентов с атипичной тератоидно/рабдоидной опухолью проводили по протоколу Rabdoid 2007: карбоплатином, метотрексатом, этопозидом и винкристином, отдельным пациентам назначали циклофосфамид или TMZ. Пациентов с нейробластомой лечили согласно протоколу NB-2004: CSP (карбоплатином), этопозидом, циклофосфамидом и винкристином [344, 345, 346]. Для определения диагностической эффективности способа рассчитывали его чувствительность (Se), специфичность (Sp), положительную (+PV) и отрицательную (-PV) прогностическую значимости.

Чувствительность определяли как долю образцов в клетках с «умеренной» и «высокой» чувствительностью в группе «с ответом на терапию» по формуле 2.7:

$$Se = \frac{a}{(a+c)} \times 100\% \quad (2.7)$$

где Se – чувствительность, а – истинно положительный результат – количество образцов чувствительных клеток в группе пациентов с «ответом на терапию»; с – ложноотрицательный результат – число образцов резистентных клеток в группе пациентов с «ответом на терапию». Чувствительность показывает количество истинных положительных результатов в группе пациентов.

Специфичность выражали как процент резистентных и низкочувствительных образцов *in vitro* в группе «без ответа» на терапию опухолей по формуле 2.8:

$$Sp = \frac{d}{(b+d)} \times 100\% \quad (2.8)$$

где Sp – специфичность способа; b – ложноположительный результат – количество образцов чувствительных клеток в группе пациентов «без ответа на терапию»; d – истинно отрицательный результат – количество образцов резистентных клеток в группе пациентов «без ответа на терапию» [117]. Специфичность показывает количество истинных отрицательных результатов в группе пациентов.

Положительную прогностическую значимость способа (+PV) определяли по формуле 2.9:

$$(+PV) = \frac{a}{(a+b)} \times 100\% \quad (2.9)$$

Она показывает вероятность (в %) наличия опухоли в группе пациентов при положительном диагнозе.

Отрицательную прогностическую значимость способа (-PV) рассчитывали по формуле 2.10:

$$(-PV) = \frac{d}{(d+c)} \times 100\% \quad (2.10)$$

Она показывает вероятность (в %) отсутствия опухоли в группе пациентов при отрицательном диагнозе.

Распределение химиочувствительности *in vitro* образцов всех интракраниальных опухолей в группах пациентов «с ответом» и «без ответа» на терапию, представлено в таблице 2.10.

Таблица 2.10

Ответ *in vivo* интракраниальных опухолей пациентов на 3–6 месячную химиотерапию и чувствительность клеток к химиопрепаратам *in vitro*

Чувствительность клеток мозговых опухолей к химиопрепаратам	Количество образцов интракраниальных опухолей пациентов в зависимости от ответа на курс химиотерапии, %	
	ответ на терапию (n=72)	без ответа на терапию (n=18)
Высокая	29,7 % (95/320)	9,0 % (6/67)
Умеренная	37,5 % (120/320)	34,3 % (23/67)
Низкая	32,8 % (105/320)	56,8 % (38/67)

Данные таблицы 2.10 констатируют следующие характеристики метода для пациентов с интракраниальными опухолями: чувствительность – 67,2% (215 образцов из 320 в группе «с ответом» на терапию). Специфичность – 56,8% (38 из 67 образцов в группе «без ответа» на терапию). Положительная прогностическая значимость варианта метода – 87,3% (215 образцов из 229). Отрицательная прогностическая значимость – 26,6% (38 из 143 образцов).

Представленные характеристики способа оценки химиочувствительности *in vitro* сравнили с описанными в литературе. С этой целью было проанализировано 10 статей, где изложены аналогичные параметры различных методов оценки чувствительности клеток разных гистологических типов опухолей [117, 342, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354].

Результаты обработки, содержащихся в них данных, представлены в таблице 2.11.

Таблица 2.11

Средние значения показателей различных методов анализа химиочувствительности клеток, отличных по гистологическим типам опухолей

Метод	Показатель, %			
	чувствительность (Se)	специфичность (Sp)	положительная прогностическая значимость (+PV)	отрицательная прогностическая значимость (-PV)
Метод, разработанный автором	67,2	56,8	87,3	26,6
Данные литературы	65,2±5,9 (16,6–100)	79,1±6,4 (27–100)	78,1±3,2 (42,7– 100)	76,9±5,2 (19–97,7)

Параметры чувствительности и положительной прогностической значимости (+PV) разработанного автором метода совпадают с данными литературы. Значения специфичности и отрицательной прогностической значимости несколько ниже. Возможным тому объяснением может служить небольшое количество истинно отрицательных образцов (резистентных в группе «без ответа» на терапию) при значительном их количестве среди ложноположительных (чувствительных в группе «без ответа» на терапию) и ложноотрицательных (нечувствительных в группе «с ответом» на терапию). Это связано с неоднозначной степенью гетерогенности различных типов опухолей мозга и наличием среди одного типа опухолей примерно одинаковой численности клеток, проявляющих чувствительность к химиотерапии и устойчивых к ней. Вариант оценки индивидуальной чувствительности клеток по ИЦ с применением одной концентрации не уступает в точности анализа классическому (по ИК₅₀) и предоставляет возможность в 4–5 раз снизить количество затрачиваемых реактивов, культуральной посуды и расходных материалов, а также значительно сократить продолжительность эксперимента [347].

2.8. Оценка уровня секреции интерлейкина-6 методом иммуноферментного анализа

Чтобы изучить изменения секреции ИЛ-6 в культуральной среде, на клетки ПА, АА, ГБ, МБ и эпендимомы действовали химиопрепаратами и NGF, как описано в разделе 2.6.

Кондиционированную клетками среду собирали в эппендорфы и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Определение уровня IL-6 человека проводили с использованием тест-набора для иммуноферментного анализа (BD Biosciences, США). Для этого в каждую из лунок 96-луночного планшета (Nunc, Дания) вносили 100 мкл моноклональных антител человека к IL-6, разведенных в покрывающем буфере (0,1M карбонат натрия, pH=9,5) и инкубировали при 4°C в течение 12 ч. Удаляли избыток антител и пятикратно промывали 300 мкл промывочного раствора (ФСБ с 0,05%-м твином-20). Удаляли избыточное количество буфера и снова пятикратно промывали ФСБ. В каждую лунку добавляли 200 мкл буфера для анализа (ФСБ с 10% ЭТС (Nucclone, США) и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. После удаления реагентов и пятикратного промывания в лунки вносили по 100 мкл каждого образца (кондиционированной среды) и выдерживали в течение 2 ч при 20°C. Пятикратно отмывали промывочным буфером. В каждый образец вносили по 100 мкл рабочей смеси вторичных моноклональных антител человека к IL-6, конъюгированных с биотин/стрептовидин-пероксидазой и инкубировали 1 ч при 20°C. Семикратно отмывали и вносили 100 мкл/лунку раствора субстрата (ортофенилендиамин и пероксид водорода) и ставили планшет на 30 мин в защищенное от света место при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл/пробу стоп-реагента (2M серной кислоты). Через полчаса проводили измерения при длине волны 450 нм на иммуноферментном анализаторе Biotek 808 (Instruments Inc., США) [355]. Из каждого посева, обработанного каждым реагентом, брали три аликвоты (n=1020).

2.9. Электронно-микроскопическое исследование ультраструктурных особенностей типов гибели клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы

Исследование выполнено на клетках, полученных от пациентов с ПА (n=5) и МБ (n=5). При выборе реагентов для электронно-микроскопического исследования автор руководствовался данными литературы относительно механизмов повреждающего действия химиопрепаратов на клеточные органеллы [113]. Для экспериментов выбраны химиопрепараты: CSP, алкилирующий и TMZ – метилирующий ДНК. Экспланты опухолей выращивали по описанной в разделах 2.5 методике и обрабатывали химиопрепаратами, NGF или их комбинациями. Через сутки ткани опухолей погружали в 4%-й глутаральдегид (Sigma-Aldrich, США) и хранили при 4°C. Материал проводили согласно известной в электронной микроскопии методике [356]. После образцы фиксировали 4%-м глутаральдегидом, приготовленном на ФСБ (pH=7,2) в соотношении 5:1 в течение 40 мин. Фрагменты опухолей заливали 4%-м глутаральдегидом на 24 ч, и, после трехкратного промывания, выдерживали в течение 3 ч в 2%-ной четырехокси осмия (по Мелонику). После завершения альдегид-осьмиевой фиксации, образцы промывали ФСБ на протяжении 3 ч. Трехкратно образцы обезвоживали в спиртах возрастающей крепости 30° и 50° по 10 мин в каждом и 70° – 12 ч. На следующие сутки образцы

перекладывали в уранилацетат (Sigma-Aldrich, США), насыщенный на 70°-ном спирте и выдерживали при 4°С в течение 24 ч. Экспланты последовательно трехкратно переносили в 96°-й, абсолютный спирты, ацетон – на 15 мин в каждый, – помещали в тигли со смесью равных объемов ацетона, аралдитов М и Н и термостатировали 24 ч при 37°С. Образцы раскладывали в капсулы, заполненные полимеризационной смесью состоящей из аралдитов М и Н с предвнесением катализатора – аралдита А (0,1% от ее объема), ставили в термостат последовательно на одни сутки при 37°С, на одни сутки – при 48°С, на пять и трое суток – при 56°С и 90°С соответственно. Материал резали на ультрамикротоме LKB 2088 (Leitz, Швеция), срезы контрастировали по способу Рейнольдса (Reynolds, 1961 г.) цитратом свинца (Sigma-Aldrich, США), для чего брали 45 мг реактива и разводили в 15 мл бидистиллированной воды, куда добавляли по каплям 10N гидроксид натрия, пятикратно промывали в дистиллированной воде и просматривали под электронным микроскопом JEM-100 CX (JEOL Ltd, Япония) при увеличениях 4800–14400. Каждая подсерия включала два блока и 10–66 микрофотографий. Просмотрено, отсканировано и проанализировано 417 электроннограмм.

Чтобы оценить типы гибели клеток опухолей (апоптоз, некроз, аутофагия, макропиноцитоз и смешанные типы) автор использовал наиболее типичные их ультраструктурные признаки [357]. Критерии апоптоза были следующие: 1) уменьшение размеров клеток, теряющих 1/3 объема из-за нарушения транспорта ионов и воды, их ядер и ядрышек; 2) сохранение плазмалеммы и мембран органелл в клетках благодаря их «усыханию», утрате непосредственных контактов друг с другом; 3) гиперконденсация и маргинация, распадающегося на глыбки хроматина ядер, деформация и фрагментация которых за счет ядерных белков приводит к разрывам мембран и выходу в цитоплазму молекул, вызывающих деструкцию органелл; 4) неровность контуров ядра, приобретающего лопастный вид с последующим коллапсом и распадом на микроядра; 5) мембранное пузырение («блеббинг»); 6) образование апоптотических тел; 7) изменение формы прилегающих к ядру митохондрий и уплотнение их матрикса; 8) вакуолизация цитоплазмы и распад ее на дискретные структуры; 9) расширение цистерн эндоплазматического ретикулаума (ЭПР); 10) агрегация рибосом в кристаллоподобные структуры; 11) разрушение ДНК, распад клеток на окруженные мембранами плотные образования [358].

Признаки некроза были следующие: 1) набухание клеток по причине отека органелл; 2) разрывы наружной мембраны, ведущие к активации лизосомальных ферментов; 3) вакуолизация цитоплазмы, приводящая к формированию одной крупной или нескольких мелких вакуолей; 4) образование липидных капель; 5) разрушение ядра (кариолизис), сочетающееся с распадом цитоплазмы на поздних стадиях процесса; 6) умеренная конденсация

хроматина или ее отсутствие; 7) гипертрофия, измененных по форме митохондрий с просветлением матрикса в силу кристолизиса [359, 360].

Аутофагию характеризовали: 1) вакуолизация цитоплазмы, связанная с появлением сдвоенных мембранных вакуолей – аутофагосом, которые объединялись с эндосомами и лизосомами; 2) увеличение лизосомальной активности; 3) сохранение целостности плазмалеммы; 4) исчезновение, частичная конденсация хроматина или пикноз ядра; 5) деградация эндоплазматического ретикулума, комплексов Гольджи, липидных капель; 6) гипертрофия митохондрий, усиление их проницаемости, просветление матрикса по причине кристолизиса; 7) отсутствие фрагментации ядра и клетки на поздних стадиях гибели; 8) длительное сохранение микротрубочек и промежуточных микрофиламентов [237].

Макропиноцитоз [361] рассматривается как очередной (помимо апоптоза и аутофагии) каспазозависимый механизм гибели клеток, включающий: 1) образование крупных (до 5 мкм) одиночных вакуолей – макропиноцитом вследствие неспецифического поглощения ламеллоподиями экстрацеллюлярных капель жидкости и малых молекул; 2) минорная деструкция ДНК.

Количественный анализ включал параметры площадей (планиметрия) ядер, ядрышек, ЭПР, митохондрий, комплексов Гольджи, липидных капель, вакуолей, конденсированного хроматина, первичных и вторичных лизосом, пиносом с вычислением ядерно-цитоплазматических соотношений (ЯЦС) и участков лизиса. Учитывали электронную плотность отдельных органелл. Все измерения проводили с использованием программы ImageJ (версия 1.38r). Подсчитывали количество клеток с конденсированным и фрагментированным хроматином, вычисляя процент апоптотических клеток – абсолютный апоптотический индекс (ААИ) по формуле 2.11 [362].

$$\text{ААИ} = \frac{\text{Число апоптотических клеток}}{\text{Общее число погибших клеток}} \times 100\% \quad (2.11)$$

Рассчитывали абсолютный некротический индекс (формула 2.12):

$$\text{АНИ} = \frac{\text{Число некротических клеток}}{\text{Общее число погибших клеток}} \times 100\% \quad (2.12)$$

Абсолютный индекс гибели клеток по смешанному типу (формула 2.13):

$$\text{АИСТ} = \frac{\text{Число клеток, погибших по смешанному типу}}{\text{Общее число погибших клеток}} \times 100\% \quad (2.13)$$

2.10. Оценка жизнеспособности клеток глиомы U251 при помощи ДНК-связывающих красителей YO-PRO-1 и пропидий йодида методом проточной цитометрии

Для определения доли опухолевых клеток, погибающих по пути апоптоза или некроза при действии NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами, клетки (1×10^6 /мл) окрашивали флуоресцентными ДНК-связывающими красителями YO-PRO-1 и йодидом пропидия (PI). Пропидий йодид связывается с ДНК за счёт интеркаляции между гуанин-

цитозиновыми нуклеотидами, после чего его флуоресценция возрастает в 20–30 раз с максимумом возбуждения на длине волны 535 нм и максимумом испускания в красной области (617 нм) [363, 364]. PI не способен проникать через неповреждённые мембраны живых клеток, поэтому может накапливаться в клетках либо на поздних стадиях апоптоза, когда начинается вторичный некроз, либо в случае изначально некротического варианта их гибели [358].

Для оценки ранней гибели клеток с поврежденной мембраной использовали зеленый флуоресцентный ДНК-маркер YO-PRO-1 (YP1) [365]. YO-PRO-1 имеет большой размер (630 Да), который препятствует его проникновению через мембрану живых клеток. Однако при апоптозе, когда нарушается целостность мембран, YO-PRO-1 проникает внутрь клеток и связывается с ДНК, после чего флуоресценция красителя возрастает с максимумом возбуждения при длине волны 491 нм и эмиссии при длине волны 509 нм [366]. Сочетанное применение PI и YO-PRO-1 позволяет дифференцировать клетки, вошедшие в ранний апоптоз (зелёная флуоресценция YO-PRO-1), от клеток на поздних стадиях апоптоза или некроза (красная флуоресценция PI). В экспериментах использовали суспензию клеток глиомы U251 в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Объём проб для проточной цитометрии составлял 500 мкл. Также готовили контроль интактных клеток, в который вместо тестируемых реагентов вносили соответствующий объём ФСБ. Экспериментальные пробы и контроль инкубировали в течение 1 сут при температуре 37°C и 5% CO₂. После инкубации клетки осаждали путём центрифугирования при 1000 g в течение 10 мин и ресуспендировали в 500 мкл ФСБ. Окрашивание клеток YO-PRO-1 и PI проводили в пробирках для цитометрического учета 12×75 мм (Beckman Coulter, США). Для этого к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 5 мкл 20-кратного рабочего раствора YO-PRO-1 (Invitrogen, США) с концентрацией 250 нМ. Рабочий раствор готовили *ex tempore*, добавляя к 10 мкл стокового раствора (100 мкМ ДМСО) 190 мкл ФСБ. После чего к образцам добавляли по 10 мкл раствора PI (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мкг/мл. Окрашивание проводили при комнатной температуре в течение 15 мин в защищенном от света месте. После инкубации к образцам добавляли по 200 мкл ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 50000 одиночных клеток. Чтобы отличить одиночные клетки от агрегатов и в последующем дискриминировать агрегаты из анализа, использовали следующие сочетания сигналов по прямому (величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию – интенсивность пикового против интенсивности интегрального сигналов по FS или SS, а также время полета против интенсивности интегрального сигналов FS или SS. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Kaluza™ (Beckman Coulter, США), рисунок 2.10.

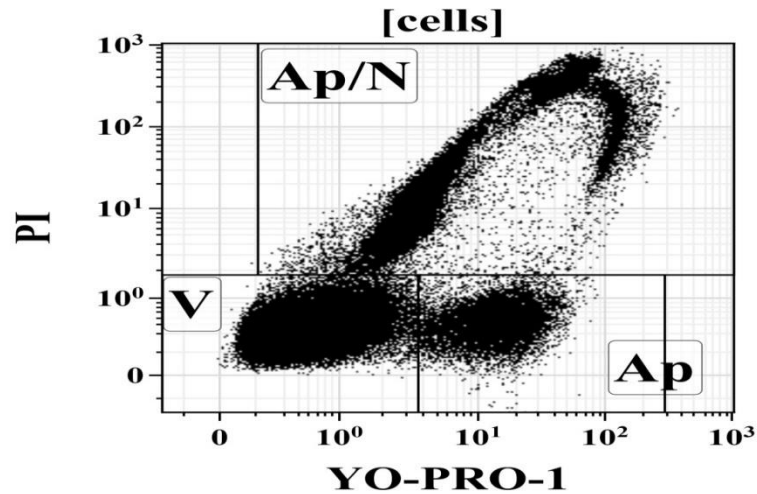


Рисунок 2.10. Окрашивание клеток ДНК-связывающими красителями YO-PRO-1 и PI

2.11. Спектрофотометрический метод определения активности каспазы-3

Активность каспазы-3 определяли колориметрическим (спектрофотометрическим) методом, основанным на расщеплении этим ферментом синтетического субстрата Ac-DEVD-pNA (ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп р-нитроанилида) при помощи набора «Caspase3 Assay Kit, Colorimetric» (Sigma, США). Гидролитическое расщепление субстрата под действием каспазы-3 приводит к высвобождению р-нитроанилида (pNA), имеющего пик поглощения при длине волны 405 нм (коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon^{\text{mM}} = 10,5$).

В эксперименте использовали суспензию клеток глиомы U251 в концентрации $5,5 \times 10^6$ клеток/мл. Объём проб составлял 100 мкл. К 90 мкл клеточной суспензии добавляли 10 мкл раствора PG-1, этопозида и их комбинации в стерильном ФСБ в вышеприведенных концентрациях (п. 2.5). Также готовили контроль интактных клеток, в который вместо реагентов вносили соответствующий объём ФСБ. Как экспериментальные пробы, так и контроль инкубировали в течение 3 ч в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C.

После инкубации клетки осаждали путём центрифугирования при 600 g с охлаждением до 4°C в течение 5 мин, супернатант из эппендорфов (объёмом 1,5 мл) удаляли за счёт осторожного встряхивания, после чего однократно отмывали клетки 500 мкл ФСБ при тех же условиях. После отмывки для ресуспендирования использовали входящий в набор лизирующий буфер (50 мкл на пробу) и инкубировали на ледяной бане в течение 30 мин. После инкубации обломки лизированных клеток осаждали путём центрифугирования при 10000 g в течение 20 мин с охлаждением до 4°C. Супернатанты отбирали и незамедлительно использовали для приготовления экспериментальных проб. Экспериментальные пробы готовили в соответствии с прилагающимися к набору инструкцией [367] по схеме для 96-луночного планшета. Использовали три параллели проб, содержащих ингибитор каспазы-3, и три параллели – не содержащих ингибитора, а также контроли, в которые вместо лизатов клеток был внесён активный препарат каспазы-3 (чтобы убедиться в пригодности субстрата для анализа и

активности ингибитора). Планшеты с пробами инкубировали при температуре 37°C в течение 18 ч (на ночь), затем измеряли оптическую плотность проб на длине волны 405 нм при помощи спектрофотометра SpectraMax250 (Molecular Devices, США). Концентрацию pNA рассчитывали при помощи коэффициента молярной экстинкции. Активность каспазы определяли по формуле 2.14:

$$Act(\text{мкМ}[pNA] \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}) = \frac{C[pNA] \cdot d}{t \cdot V}, \quad (2.14)$$

где $C[pNA]$ – концентрация pNA в мкМ, d – коэффициент разведения, t – время реакции в минутах, V – объём пробы в мл.

Также производили сравнение с контролем клеток, не подвергавшихся обработке реагентами, при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни ($p < 0,05$).

2.12. Иммунофлуоресцентное определение экспрессии TrkA и p75 рецепторов и их соотношения на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы

Оценивали экспрессию TrkA, p75 рецепторов на клетках, полученных от пациентов с АА ($n=5$), ГБ ($n=7$) и МБ ($n=7$). Их клетки культивировали, как описано в разделе 2.4. В каждую чашку Петри, по истечении двух суток роста клеток, вносили NGF либо его комбинации с CSP или TMZ. Спустя сутки среду удаляли, посеы пятикратно промывали ФСБ (145 мМ хлорида, 7,3 мМ гидрофосфата и 2,7 мМ дигидрофосфата натрия, pH=7,2), содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина, 4% козьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) и 0,2%-го тритона X-100. На образцы для блокировки рецепторов наносили первичные моноклональные антитела к рецепторам NGF: Anti-TrkA (SAB4902032, Sigma-Aldrich, США) и Anti-p75 (Pan-NGFR, Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:100. Указанные антитела разводили ФСБ на 0,3%-м тритоне X-100. Клетки с антителами инкубировали в течение 24 ч при 4°C. После трехкратного промывания ФСБ, клетки подвергали действию вторичных кроличьих FITC-конъюгированных антител: Anti-Rabbit Ig-FITC (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:1000 и выдерживали в темном месте на протяжении 2 ч при комнатной температуре [368]. После инкубации посеы трижды отмывали от избытка реагентов и просматривали под флуоресцентным микроскопом Leitz MPV-2 (Германия) с цифровой камерой Leica DC350F (Германия) с возбуждающим 330–390 нм и эмиссионным 455–700 нм фильтрами L2, экспозицией 690 мс, усилением G1 при увеличении объектива $\times 16$. Делали калибровку для данного объектива, чтобы перевести пиксели в мкм. Применяя компьютерную программу ImageJ (версия 1.45r), оценивали: 1) процентное соотношение флуоресцирующих клеток к их общему количеству в пяти полях зрения для каждого образца; 2) интенсивность флуоресценции (пиксел/мкм²) в расчете на одну клетку; 3) используя эти показатели, рассчитывали соотношение TrkA/p75-рецепторов. Определяли

корреляции между соотношением TrkA/p75-рецепторов и ИЦ NGF, его комбинаций с химиопрепаратами. Проанализировано 800 посевов.

2.13. Идентификация численности копий *MYCC*- и *MYCN*- онкогенов в интерфазных клетках медуллобластомы с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации

Данное исследование проведено на базе лаборатории цитогенетики государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь» на клетках МБ, полученных от 9 пациентов.

2.13.1. Приготовление мазков-отпечатков опухоли

К обезжиренным предметным стеклам несколько раз прикладывали срезом фрагмент опухоли и подписывали по шлифу. Качество материала контролировали под световым микроскопом на увеличении $\times 100$. После высыхания стекла опускали в охлажденный до -20°C фиксатор (смесь 96% метанола и 99,5% ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1, Sigma-Aldrich, США) на одни сутки.

2.13.2. Фиксация клеток медуллобластомы

Согласно описанной в разделе 2.5 методике, выращивали клетки МБ. Посевы обрабатывали NGF в течение одних суток. Клетки снимали 0,25%-м трипсином с ЭДТА в соотношении 1:3 в течение 10 мин, переносили в пробирки и центрифугировали при 1500g в течение 10 мин. Клеточную суспензию переносили в пробирки, куда добавляли гипотонический раствор хлорида калия (0,55%) и выдерживали 10 мин на водяной бане при 37°C , затем центрифугировали при 1500g в течение 10 мин. Супернатант отбирали, а осадок ресуспензировали в 0,5–1 мл гипотонического (0,55%) раствора хлорида калия. В пробирки с клетками вносили трехкратно по каплям охлажденный до -20°C фиксатор, состоящий из смеси 96%-го метанола и 99,5%-ной ледяной уксусной кислоты в пропорции 3:1 [249].

2.13.3 Приготовление проб для *in situ* окраски флуоресцирующими зондами

В зависимости от того, использовали для анализа мазки-отпечатки или фиксированную суспензию клеток, отличалось время и этапы подготовки проб.

2.13.3.1. Приготовление стекол с мазками-отпечатками для FISH-окраски

Выдержанные в фиксаторе не менее суток, стекла высушивали при комнатной температуре в течение 2 ч в вытяжном шкафу. Стекла переносили на 2–3 ч в термостат на 56°C , затем охлаждали до комнатной температуры. Под световым микроскопом выделяли участок с наибольшей плотностью клеток. Препарат обрабатывали раствором РНКазы (Sigma-Aldrich, США, 10 мкг/мл, 15 мин при 37°C), протеиназы К (10 мкг/мл, 30 мин при 37°C), промывали в дистиллированной воде дважды и высушивали при комнатной температуре. Обработанные таким образом стекла опускали в солевой натрий-цитратный буфер (0,6М хлорида и 0,06М

цитрата натрия, pH=7,2 Sigma-Aldrich, США) на 30 мин при 37°C, дегидратировали по 2 мин в серии спиртов возрастающей крепости (70°, 80°, 96°) и сушили при комнатной температуре в течение 15–20 мин.

2.13.3.2. Приготовление клеточной суспензии для FISH-окраски

Зафиксированные клетки выдерживали в фиксаторе при 4°C не меньше 2 ч. Отмывали в новом свежеприготовленном охлажденном до -20°C фиксаторе и раскапывали на стекла. Качество нанесенного материала контролировали под световым микроскопом при ×100). Стекла высушивали при комнатной температуре в течение 2 ч в вытяжном шкафу и переносили в термостат на 2–3 ч (при 56°C) или выдерживали при комнатной температуре в течение 2–3-х сут. Обработку РНКазой или протеиназой К не проводили. После «состаривания» стекла опускали в солевой натрий-цитратный буфер на 30 мин при 37°C и дегидратировали 2 мин в спиртах возрастающей крепости (70°, 80°, 96°) с последующим высушиванием при комнатной температуре в течение 15–20 мин.

2.13.4. Окрашивание интерфазных ядер методом флуоресцентной in situ гибридизации

На стекла с фиксированными клетками в выделенный участок наносили смесь ДНК-зонда (7 мкл Vysis LSI/WSP буфера, 2 мкл воды и 1 мкл ДНК-зонда), накрывали покровным стеклом (22×22 мм) и заклеивали резиновым клеем. Для определения примерной ploидности клеток использовали зонды VysisLSI MYCC (8q24.12–q24.13) и VysisLSI MYCN (2p24), меченные флуорохромом SpectrumOrange (Abbott Molecular, США). После нанесения 0,5 мкл смеси зондов, сразу проводили денатурацию ДНК при 73°C в течение 5 мин и ставили в гибридизатор (Dako, США) при 37°C на 16–18 ч. По окончании гибридизации, аккуратно снимали клей с покровных стекол, которые опускали на 2 мин в прогретый до 73°C солевой раствор 0,4× натрий-цитратного буфера с добавлением 0,3% детергента нонилфенокси-полиэтоксиэтанола (NP40, Thermo scientific, США) на 2 мин. Стекла переносили в солевой раствор натрий-цитратного буфера с добавлением 0,1% NP40 на 10 мин. Образцы дегидратировали 2 мин в серии спиртов возрастающей крепости (70°, 80°, 96°) и высушивали при комнатной температуре 15–20 мин в темном месте. На высохшие стекла в отмеченную область наносили рабочий раствор 4,6-диамино-2-фенилиндолдигидрохлорида (DAPI, 1,5 мкг/мл), приготовленный на ФСБ, окрашивали 10–15 мин, покрывали покровным стеклом и анализировали.

2.13.5. Анализ результатов

Препараты просматривали на флуоресцентном микроскопе Leica DMLB (Германия) с фильтрами для флуорохромов DAPI, TexasRed, FITC при общем увеличении 1000 (объектив ×100 масляная иммерсия; окуляры ×10). Подсчитывали общее количество, но не менее 100 клеток в поле зрения, а также их численность с каждым набором (n) онкогенов. Из опухолевой ткани каждого пациента готовили не менее трех посевов. Образцы были зарегистрированы в

соответствии с рекомендациями международной номенклатуры цитогенетики человека ISCN 2013 [369]. Проанализировано 108 посевов

2.14. Статистическая обработка данных

Каждый эксперимент проводили не менее чем в трех (три–пять) независимых повторах. Результаты представляли как средняя арифметическая плюс/минус стандартное отклонение для выборки объема n ($M \pm m$). Для сравнения двух групп со сравнительно большим объемом выборки ($n > 50$) по выраженности количественных признаков применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA one-way) и F-критерий (Фишера) [370]. Предварительно каждую выборку проверяли на нормальность (распределение Гаусса) по критерию Колмогорова-Смирнова/Лиллифора и на однородность дисперсий по F критерию. Вариабельность признаков оценивали по величине стандартного среднеквадратического отклонения (σ «сигма»). Применяя двухфакторный дисперсионный анализ без повторений (ANOVA two-way), рассчитывали уровни значимости для зависимости экспрессии TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75 от типа опухоли, механизма действия NGF и его комбинаций с химиопрепаратами. В случае отклонения нормальности в независимых выборках и наличия малого количества образцов ($n < 30$) для их сравнения использовали непараметрический критерий Манна–Уитни [371]. Установление корреляционных зависимостей между двумя неродственными показателями в выборке, подчиняющимся нормальному распределению, осуществляли с использованием коэффициента ранговой корреляции Пирсона r [371]. Статистическая значимость коэффициентов корреляций в выборках, подчиняющихся нормальному распределению, оценивали по критерию Стьюдента t [370, 371]. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Для проведения описательной статистики и оценки статистической значимости различий между двумя группами данных использовали программы StatPlus 2005 пакета Statistica 6.0 и GraphPad Prism 8.1. Рисунки выполнены в графическом редакторе Excel 2010.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Определение цитотоксической активности фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 в отношении клеток интракраниальных опухолей

3.1.1. Оценка цитотоксической активности фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 в отношении клеток глиомы С6 крысы

Для определения цитотоксической противоопухолевой активности NGF, PG-1 и LL-37 в отношении клеток глиомы С6 и U251 их действие сравнивали по ИК₅₀ с химиопрепаратами (CSP и TMZ) в МТТ тесте или, обрабатывая клетки витальным красителем трипановым синим (таблица 3.1).

Таблица 3.1

Показатели ИК₅₀ химиопрепаратов, NGF, LL-37, PG-1 при *in vitro* действии на клетки глиомы С6 в МТТ- тесте и экспериментах с обработкой клеток трипановым синим

Серия	ИК ₅₀ , мкМ в МТТ тесте	ИК ₅₀ , мкМ в тесте с трипановым синим
Темозоломид	391,5	134,8
Цисплатин	81,2	82,2
NGF	0,0148	0,0025
LL-37	1,1	1,1
PG-1	10,1	8,6

Данные в таблице 3.1, показывают, что наибольшую противоопухолевую активность в отношении клеток глиомы С6 *in vitro* проявляет NGF (ИК₅₀ 0,0148 и 0,0025 мкМ). Тогда как LL-37 и PG-1 также оказывают выраженное противоопухолевое действие, превосходящее по показателям эффекты химиопрепаратов, как по результатам МТТ теста (1,1 и 10,1 мкМ), так и при применении красителя трипанового синего (1,1 и 8,6 мкМ). Кроме того, показатели ИК₅₀ NGF, PG-1 и LL-37 были ниже, чем ИК₅₀ доксорубицина, карбоплатина и этопозида в отношении клеток глиомы С6 по результатам МТТ теста и при применении красителя трипанового синего (данные не показаны).

Согласно руководству по доклиническому испытанию лекарственных средств, соединение нового класса считается цитотоксически активным при ИК₅₀ ≤ 10⁻⁴М, аналог известного противоопухолевого препарата оценивается как цитотоксичный, если его ИК₅₀ ≤ ИК₅₀ препарата сравнения [18]. Поскольку ИК₅₀ NGF, LL-37 и PG-1 значительно меньше 10⁻⁴М, поэтому их можно считать соединениями, обладающих противоопухолевой цитотоксической активностью.

3.1.2. Оценка цитотоксической активности фактора роста нервов, протезгина-1 и кателицидина LL-37 в отношении клеток глиомы U251 человека

Цитотоксическую противоопухолевую активность NGF, PG-1 и LL-37 оценивали по ИК₅₀ также в отношении клеток глиомы U251, сравнивая с активностью химиопрепаратов (CSP и TMZ) по результатам МТТ теста и теста с трипановым синим (таблица 3.2).

Таблица 3.2

Показатели ИК₅₀ химиопрепаратов, NGF, LL-37, PG-1 при *in vitro* действии на клетки глиомы U251 в МТТ- тесте и экспериментах с обработкой клеток трипановым синим

Серия	ИК ₅₀ , мкМ в МТТ тесте	ИК ₅₀ , мкМ в тесте с трипановым синим
Темозоломид	1725,7	1613
Цисплатин	371,5	228,9
NGF	0,0214	0,0035
LL-37	3,1	1,9
PG-1	26,1	10,5

Данные таблицы 3.2 показывают, что также как на клетках С6, наибольшую противоопухолевую активность в отношении клеток глиомы U251 проявляет NGF (ИК₅₀ 0,0214 и 0,0035 мкМ). Интересно, что клетки U251 оказались чувствительнее к NGF в 6,9 раза и устойчивее в 1,4 раза, чем клетки глиомы С6 соответственно по данным МТТ и теста с трипановым синим. LL-37 и PG-1 обладают сильной противоопухолевой активностью, превосходящей действие CSP и TMZ по результатам МТТ теста (3,1 и 26,1 мкМ) и в тесте с трипановым синим (1,9 и 10,5 мкМ). Кроме того, показатели ИК₅₀ NGF, PG-1 и LL-37 были ниже, чем ИК₅₀ доксорубицина, карбоплатина и этопозиды в отношении клеток глиомы U251 по результатам МТТ теста и при применении красителя трипанового синего (данные не показаны). Однако, клетки U251 оказались устойчивее к LL-37 в 2,9 раза и PG-1 в 2,6 раза в МТТ тесте и в 1,7 и 1,2 раза в тесте с трипановым синим. Вместе с тем, клетки U251 оказались устойчивее к химиопрепаратам, чем клетки глиомы С6: к TMZ – в 4,4, CSP – в 4,6 раза по результатам МТТ теста. Клетки глиомы U251 также проявляют большую резистентность по сравнению с глиомой С6 к TMZ – в 12,0 раз, CSP и этопозиду – в 2,8 раза в тесте с трипановым синим.

С другой стороны, поскольку ГБ является наиболее злокачественной опухолью головного мозга у взрослого населения, ее химиотерапия проводится с использованием протоколов, в которые включены доксорубицин (25 мг/м²) [12], карбоплатин (400 мг/м²) [372], TMZ 150 (мг/м²) [373], CSP (100 мг/м²) и этопозид (100 мг/м²) [374], то при противоопухолевая активность NGF, LL-37 и PG-1 в дозах ИК₅₀ оказалась даже выше, чем действие доксорубицина, карбоплатина, TMZ, этопозиды на клетках U251 по результатам МТТ теста (рисунок 3.1).

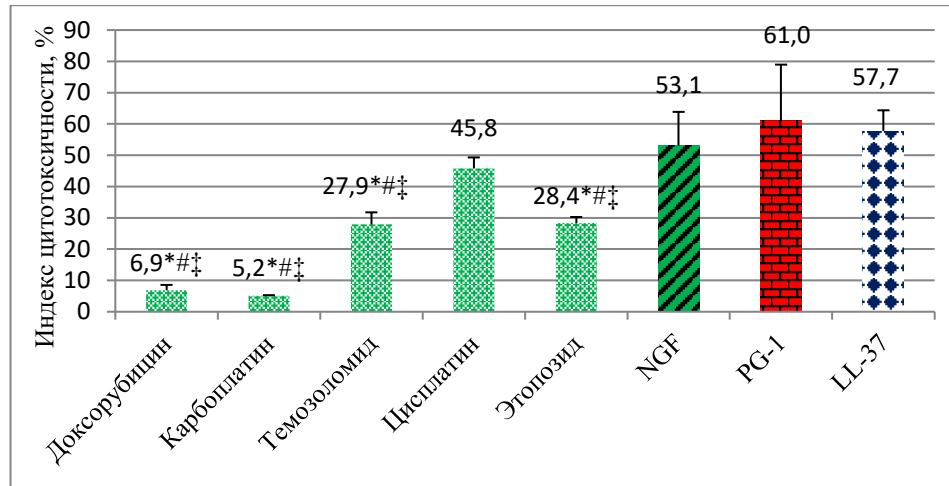


Рисунок 3.1. Индекс цитотоксичности (%) NGF, LL-37, PG-1 и химиопрепаратов при *in vitro* действии на клетки глиомы U251 в МТТ тесте

Знаком * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от NGF, # – статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от PG-1, ‡ – статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от LL-37

Таким образом, NGF, LL-37, PG-1 оказывают сильное цитотоксическое действие, даже превышающее активность химиопрепаратов в отношении клеток глиом С6 и U251.

3.1.3. Оценка цитотоксического действия фактора роста нервов и химиопрепаратов на клетках пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека

Сравнивали активность NGF с действием *in vitro* химиопрепаратов в отношении клеток ПА, АА, ГБ и МБ (рисунки 3.2, 3.3, 3.4, 3.5). С этой целью рассчитывали среднее значение ИЦ химиопрепаратов для каждого типа опухоли. Были выделены 3 группы: 1) химиопрепараты, ИЦ которых превышает ($p < 0,05$) среднее значение ИЦ химиопрепаратов; 2) реагенты, ИЦ которых не отличается ($p > 0,05$) от среднего значения ИЦ химиопрепаратов; 3) химиопрепараты, ИЦ которых ниже ($p < 0,05$) среднего значения ИЦ химиопрепаратов [111].

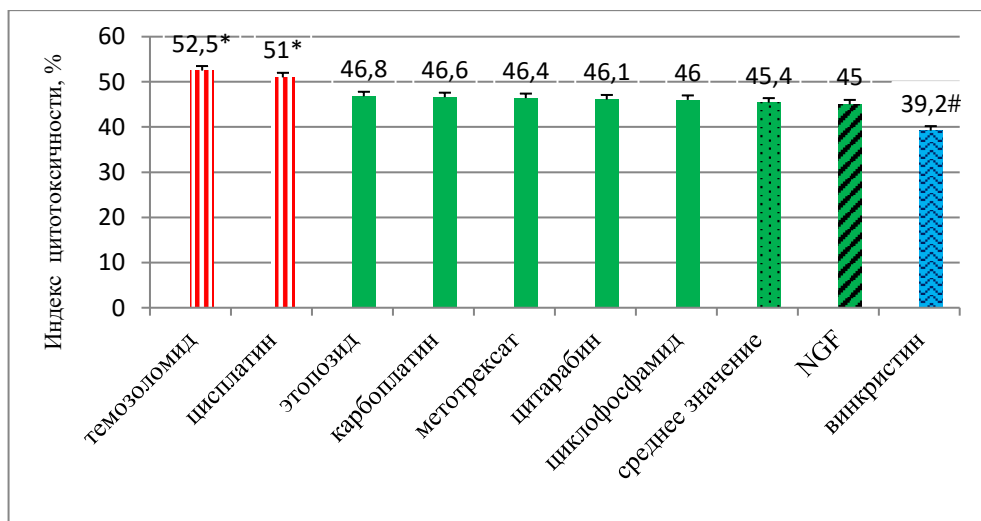


Рисунок 3.2. ИЦ (%) химиопрепаратов и NGF при действии *in vitro* на клетки ПА

Здесь и на рисунках 3.3, 3.4, 3.5 красным цветом и знаком * обозначены химиопрепараты, ИЦ которых превышает ($p < 0,05$) среднее значение ИЦ химиопрепаратов; зеленым цветом – реагенты, ИЦ которых не отличается от среднего значения ИЦ химиопрепаратов; знаком # и синим цветом – химиопрепараты, ИЦ которых ниже ($p < 0,05$) среднего значения ИЦ химиопрепаратов

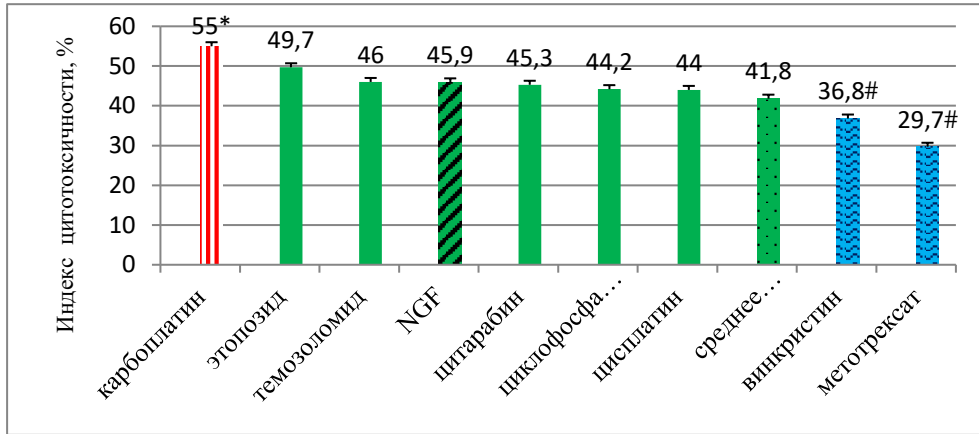


Рисунок 3.3. ИЦ (%) химиопрепаратов и NGF при действии *in vitro* на клетки АА

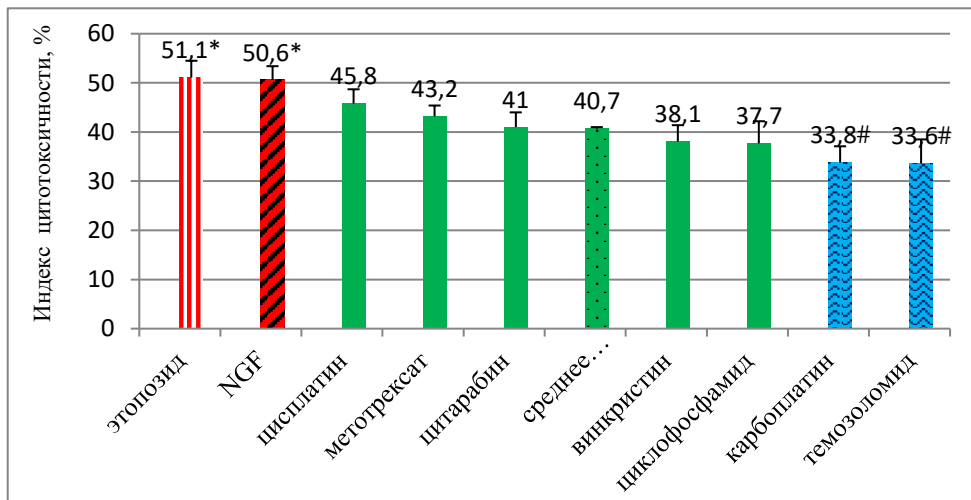


Рисунок 3.4. ИЦ (%) химиопрепаратов и NGF при *in vitro* действии на клетки ГБ

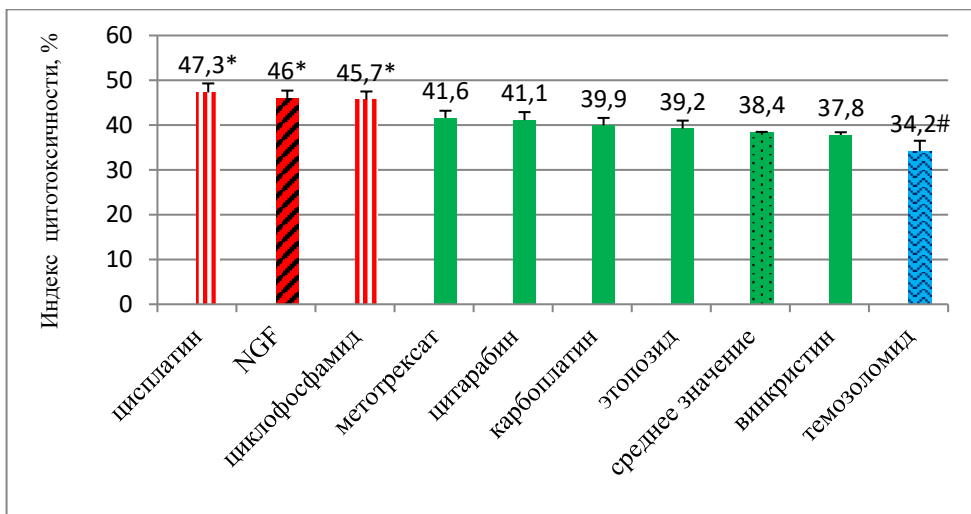


Рисунок 3.5. ИЦ (%) химиопрепаратов и NGF при *in vitro* действии на клетки МБ

Из данных на рисунках 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 следует, что цитотоксическое действие NGF ($8,8 \times 10^{-9} \text{M}$, 0,1 мкг/мл) статистически значительно превышает действие химиопрепаратов на клетки ГБ ($p=4,3 \times 10^{-7}$) и МБ ($p=1,2 \times 10^{-6}$). Цитотоксическая активность NGF статистически значимо не отличается от действия химиопрепаратов на клетках ПА ($p=0,068$) и АА ($p=0,52$). Таким образом, установлено, что NGF оказывает цитотоксическую противоопухолевую активность в отношении клеток ПА, АА, ГБ и МБ, сопоставимое или превосходящее действие химиопрепаратов.

3.1.4. Оценка индивидуальной чувствительности клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека к химиопрепаратам и фактору роста нервов

Индивидуальная чувствительность к химиопрепаратам и NGF изучена на клетках ПА, АА, ГБ и МБ, рисунки 3.6, 3.7, 3.8, 3.9.

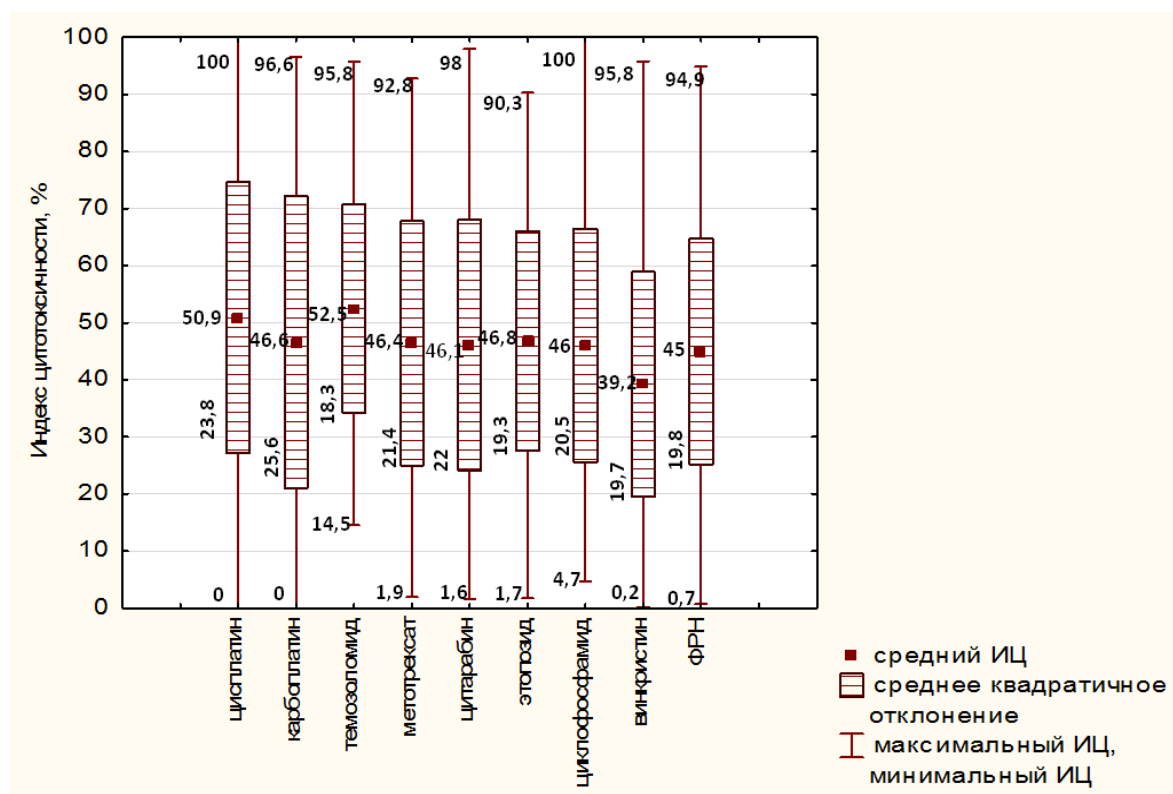


Рисунок 3.6. Вариабельность ИЦ химиопрепаратов и NGF при односуточном *in vitro* действии на клетки ПА

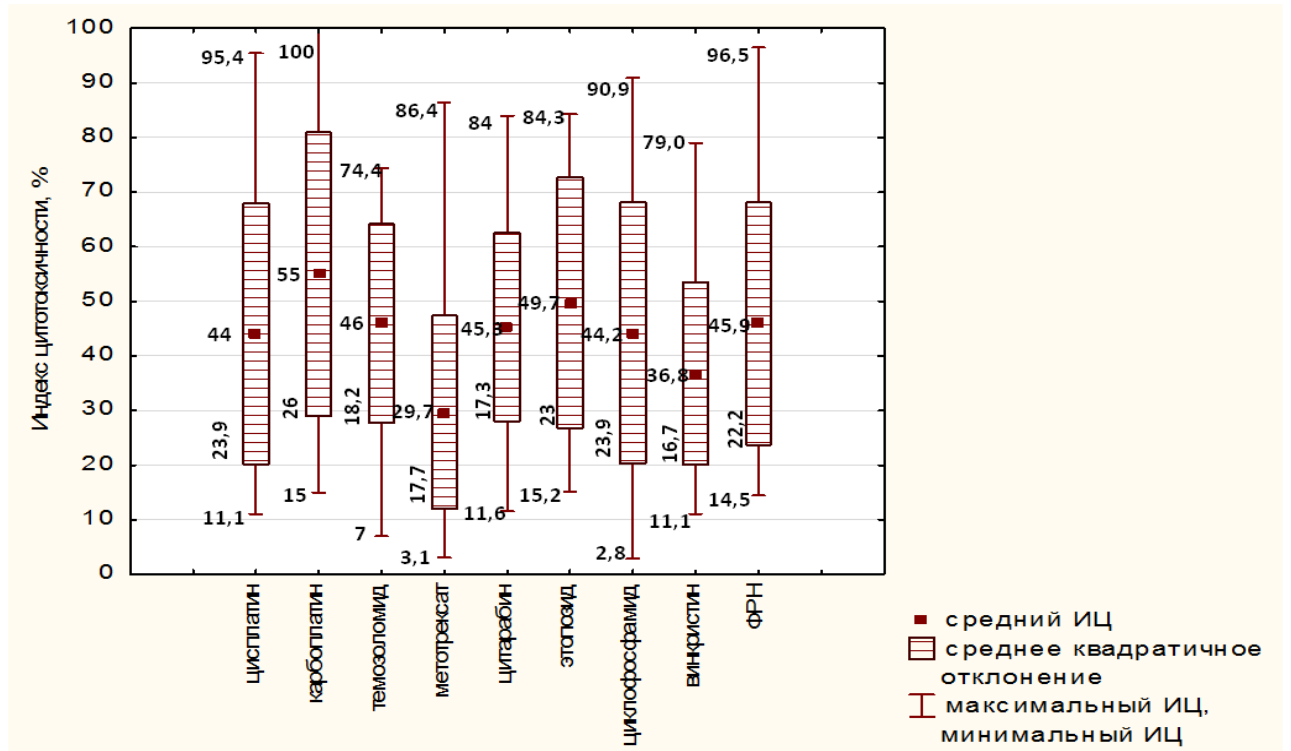


Рисунок 3.7. Вариабельность ИЦ химиопрепаратов и NGF при односуточном *in vitro* действии на клетки АА

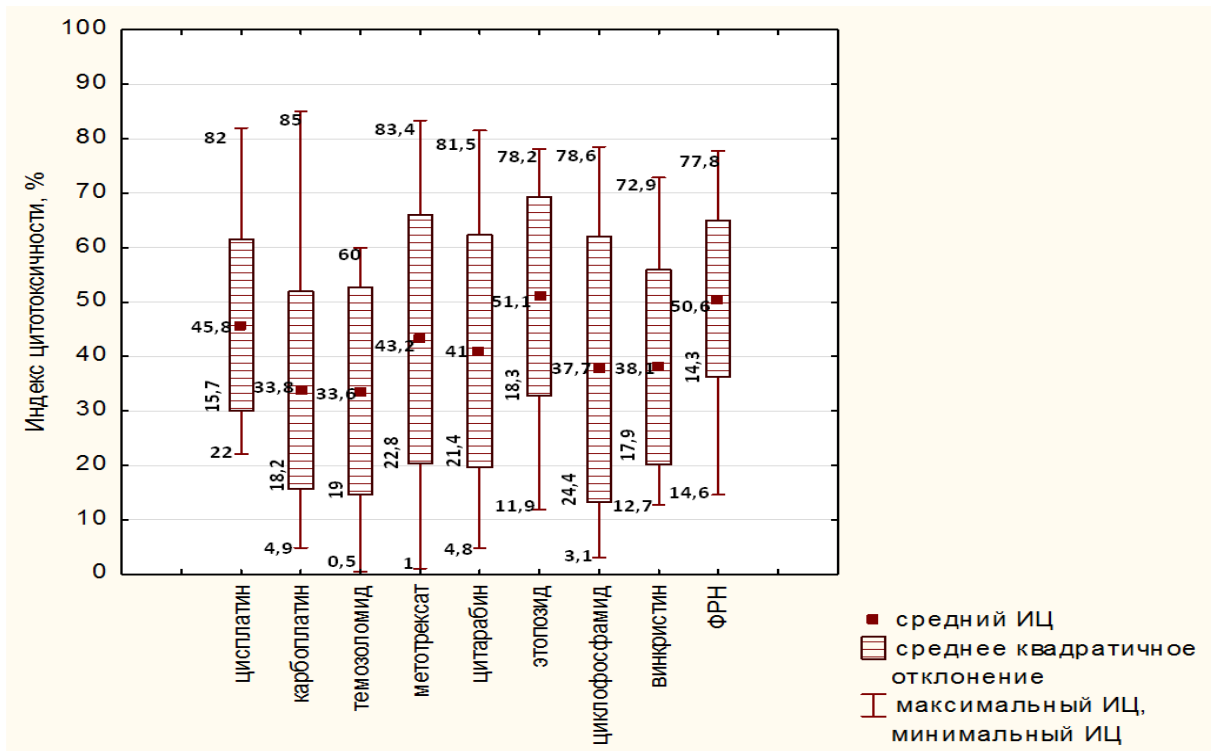


Рисунок 3.8. Вариабельность ИЦ химиопрепаратов и NGF при односуточном *in vitro* действии на клетки ГБ

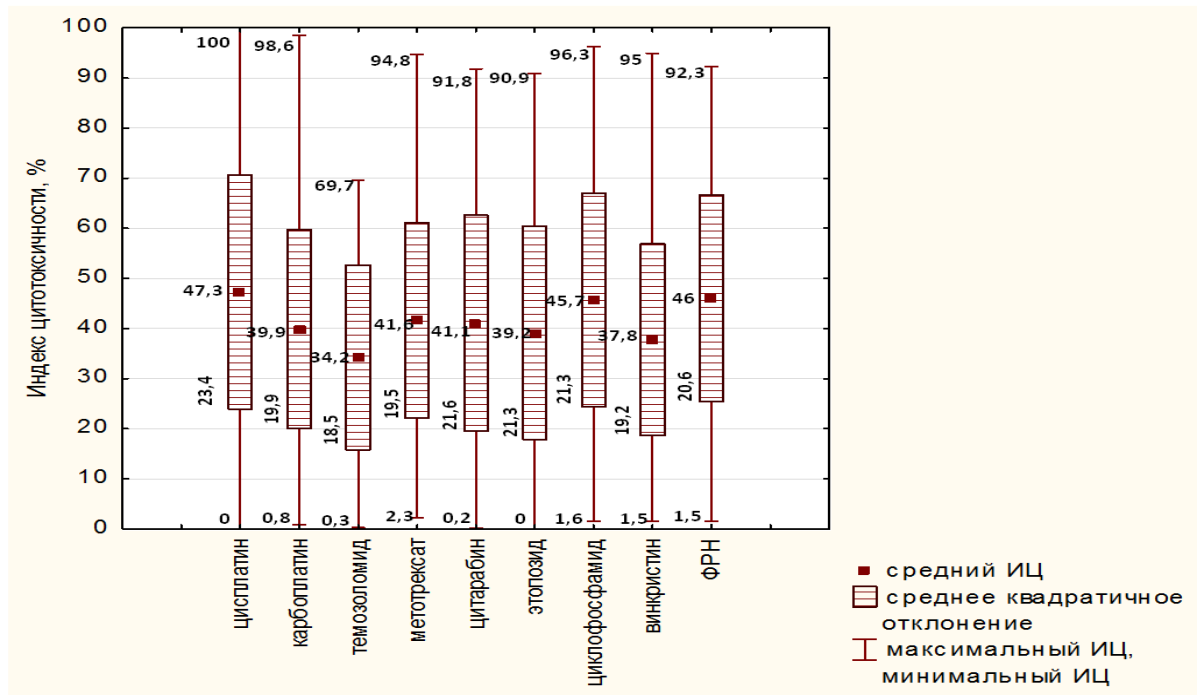


Рисунок 3.9. Вариабельность ИЦ химиопрепаратов и NGF при односуточном *in vitro* действии на клетки МБ

Данные рисунков 3.7–3.10 показывают наличие индивидуальной чувствительности клеток ПА, АА, ГБ и МБ к химиопрепаратам и NGF, выраженной значениями ИЦ и величиной среднеквадратического отклонения, свидетельствуя, что в результате действия определенного химиопрепарата на клетки опухолей, относящихся к одному гистологическому типу, но взятых от различных пациентов наблюдаются статистически значимые различия между пациентами ИЦ данного химиопрепарата. Наиболее высокие значения индивидуальных различий ИЦ (представленные величиной среднеквадратического отклонения) установлены для карбоплатина при нанесении на клетки ПА (отклонение – 25,6%) и АА (отклонение – 26,0%), циклофосфамида на клетки ГБ (отклонение – 24,4%) и CSP на клетки МБ (отклонение – 23,4%).

Среднеквадратическое отклонение NGF, было меньше данного показателя для всех химиопрепаратов в отношении клеток ГБ, CSP, карбоплатина, метотрексата, цитарабина, циклофосфамида на клетки ПА, CSP, этопозид, циклофосфамида, карбоплатина, цитарабина, оказывающих действие на клетки АА и МБ, что свидетельствует о более универсальном (менее индивидуальном) действии NGF.

Оценка персонафицированной чувствительности клеток ПА, АА, ГБ и МБ к химиопрепаратам позволяет сравнивать их действие (по величине ИЦ) у конкретного пациента для выбора химиопрепарата с наибольшим цитотоксическим действием (таблицы 3.3, 3.4, 3.5, 3.6) [109].

Таблица 3.3

Индивидуальные различия ИЦ химиопрепаратов и NGF на клетках ПА пациентов

Реагент	Индекс цитотоксичности, %						
	18662	15276	29978	18119	8511	24247	17660
Винкристин	49,4±3,4	24,4±2,2	92,4±2,3	33,7±4,1	23,9±2,5	67,4±6,8	15,0±4,3
Карбоплатин	39,4 ± 5,6	37,9 ± 6,9	57,7 ± 3,2	34,9 ± 11,6	41,1 ± 4,4	58,3 ± 10,4	15,1 ± 5,7
Метотрексат	64,8 ± 3,6	68,7 ± 3,9*	79,4 ± 0,5	43,2 ± 3,4	37,3 ± 3,4	39,2 ± 6,8	23,4 ± 6,3
Темозоломид	–	–	–	–	–	–	31,5 ± 4,4
Циклофосфамид	45,8±3,3	29,2±6,4	70,8±8,3	69,1 ± 4,8	13,2±2,6	34,4±8,7	41,1±6,5
Цисплатин	96,9 ± 1,6	48,7 ± 6,8	75,9 ± 0,7	59,9 ± 12,6	34,0 ± 1,4	66,5 ± 9,4	36,9 ± 8,6
Цитарабин	55,5± 12,3	22,2 ± 5,2	66,3 ± 1,8	58,9 ± 6,7	27,3 ± 5,8	69,7± 6,1	39,4 ± 3,6
Этопозид	55,6 ± 8,5	45,7 ± 4,6	57,1 ± 2,0	57,6 ± 3,9	20,9 ± 2,5	63,3 ± 4,1	51,2 ± 3,6
NGF	61,0 ± 1,9	49,9±3,4	86,5±5,1	40,9 ± 3,8	24,7±5,1	55,3±7,0	16,9±6,6

Примечание: здесь и в таблицах 3.4, 3.5, 3.6 жирным шрифтом выделены химиопрепараты, проявляющие наибольший ИЦ у разных пациентов, 8511 и др. – номера историй пациентов (приложение таблица 1.1)

У пяти пациентов с АА (GrIII) наибольшая чувствительность ее клеток наблюдалась для карбоплатина, цитарабина, TMZ, этопозиды и CSP соответственно (таблица 3.4). ИЦ NGF также отличался у разных пациентов, достигая максимума в 91,6±2,7 % у пациента 3152.

Таблица 3.4

Индивидуальные различия ИЦ химиопрепаратов и NGF на клетках АА пациентов

Реагент	Индекс цитотоксичности, %				
	5652	30989	12796	20422	3152
Винкристин	27,6±2,3	23,8±1,6	27,8±4,5	47,9±5,0	68,0±4,5
Карбоплатин	57,9 ± 2,1	18,4 ± 1,1	21,1 ± 3,6	70,2 ± 8,6	88,5 ± 2,0
Метотрексат	28,4 ± 2,7	9,2 ± 1,4	22,3 ± 2,0	37,1 ± 3,9	47,9 ± 8,7
Темозоломид	–	–	40,4 ± 1,7	–	–
Циклофосфамид	50,3±2,4	8,8±2,0	39,0±2,7	59,2±2,6	84,4±4,3
Цисплатин	36,0 ± 3,0	20,2 ± 2,6	34,0 ± 8,7	50,5 ± 9,6	91,0 ± 4,5
Цитарабин	55,8 ± 2,7	45,2 ± 4,0	33,0 ± 3,9	34,4 ± 5,1	78,1 ± 0,5
Этопозид	38,3± 1,9	22,0 ± 2,0	30,3 ± 7,6	71,8 ± 3,1	69,9 ± 8,6
NGF	37,1±4,1	23,1±2,9	30,4±5,2	45,3±10,4	91,6±2,7

Примечание: 5652 и др. цифры – номера историй пациентов (таблица 1.2, приложение 1).

Для четырех пациентов с ГБ (GrIV, таблица 3.5) самой сильной цитотоксической активностью обладают циклофосфамид, винкристин, этопозид и CSP соответственно. В тоже время у одного и того же пациента клетки опухоли были чувствительны сразу к нескольким химиопрепаратам. Для пациента 10845 наибольшее цитотоксическое действие кроме циклофосфамида проявляют винкристин и этопозид, для пациента 24420 кроме этопозиды –

метотрексат, у пациента 988 – кроме винкристина, также эффективным оказались циклофосфамид и цитарабин. NGF оказывает на клетки ГБ разнонаправленное действие, вплоть до усиления пролиферации (ИЦ $-55,4 \pm 18,1$ у пациента 12505).

Таблица 3.5

Индивидуальные различия ИЦ химиопрепаратов и NGF на клетках ГБ пациентов

Реагент	Индекс цитотоксичности, %			
	10845	988	24420	12505
Винкристин	40,1±7,3	54,1±1,5	20,8±6,8	-7,1±3,1
Карбоплатин	26,2 ± 5,3	30,0 ± 5,5	9,0 ± 2,1	12,8 ± 3,8
Метотрексат	34,5 ± 3,0	49,1 ± 8,6	43,4 ± 3,1	6,1 ± 1,9
Темозоломид	–	–	18,4 ± 6,6	–
Циклофосфамид	45,2±7,3	52,5±4,6	37,1±6,1	4,8±1,2
Цисплатин	22,2 ± 2,8	42,3 ± 1,4	25,6 ± 2,1	23,2 ± 3,3
Цитарабин	20,7 ± 2,2*	52,6 ± 14,2	37,1 ± 8,6	-14,8 ± 7,2
Этопозид	40,0± 1,6	49,5 ± 8,5	44,5 ± 1,3	-22,6 ± 5,8
NGF	41,9±7,0	61,4±8,5	66,9±5,5	-55,4±18,7

Примечание: 988 и др. цифры – номера историй пациентов (таблица 1.3, приложение 1). Знак минус указывает на то, что препарат вызывает меньшую гибель клеток опухоли, чем в контроле, т.е. стимулирует пролиферацию

У шести пациентов с МБ наибольшей цитотоксической активностью обладают этопозид, цитарабин, CSP, TMZ, циклофосфамид и метотрексат соответственно. NGF проявляет разнонаправленное действие на МБ у разных пациентов (таблица 3.6).

Таблица 3.6

Индивидуальные различия ИЦ химиопрепаратов и NGF на клетках МБ пациентов

Реагент	Индекс цитотоксичности, %					
	23721	7233	15348	3396	27226	31590
Винкристин	53,6±8,6	31,1±3,1	35,1±3,3	50,4±5,6	33,6±3,5	8,3±1,8
Карбоплатин	19,7± 8,7	37,8 ± 1,8	27,8 ± 5,0	29,2 ± 2,9	16,7±2,7	-1,6±0,2
Метотрексат	60,7 ± 8,6	47,5 ± 6,2	37,9 ± 5,2	36,3 ± 3,2	26,9±4,1	20,2 ± 3,2
Темозоломид	–	–	47,2±4,7	57,6 ± 1,8	–	–
Циклофосфамид	41,4±6,8	44,4±3,6	40,1±3,2	50,9±3,4	82,5±4,2	-28,7±3,8
Цисплатин	51,8 ± 8,9	47,1 ± 4,3	56,4± 4,5	42,3 ± 1,1	45,5 ± 5,0	-5,2 ± 0,7
Цитарабин	8,1 ± 2,7	53,5 ± 6,5	17,6 ± 1,2	45,1 ± 5,8	20,6± 3,6	-20,2 ± 2,1
Этопозид	70,2 ± 5,2*	43,5 ± 3,2	48,8 ± 2,5	42,5 ± 5,0	38,9 ± 4,9	-20,5± 2,3
NGF	47,6±9,7	39,9±9,1	53,4±3,6	51,3±4,3	72,6±6,6	22,2±10,2

Примечание: 23721 и др. цифры – номера историй болезней пациентов (таблица 1.4, приложение 1).

Определение персонифицированной химиочувствительности клеток интракраниальных опухолей проводилось с помощью разработанного автором способа «индивидуального подбора

химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения астроцитомы (МБ, эпендимомы, атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли, нейробластомы) у ребенка», который позволяет сравнивать действие химиопрепаратов (по величине ИЦ) у конкретного пациента для выбора химиопрепарата с наибольшим цитотоксическим действием [117]. Индивидуальная чувствительность клеток ПА, АА, ГБ и МБ к NGF также подтверждает его цитотоксическое противоопухолевое действие, которое было сопоставимо с действием химиопрепаратов.

3.2. Определение цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетках интракраниальных опухолей

3.2.1. Оценка цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетках глиомы С6

Для установления цитотоксической активности комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами на клетках глиомы С6 их действие сравнивали по ИК₅₀ с обособленным действием химиопрепаратов и пептидов по результатам МТТ теста и окрашивания трипановым синим (таблицы 3.7, 3.8).

Таблица 3.7

Показатели ИК₅₀ химиопрепаратов, NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций при действии *in vitro* на клетки глиомы С6 в МТТ тесте

Серия	ИК ₅₀ реагентов, мкМ	ИК ₅₀ PG1 + химиопрепараты, мкМ	ИК ₅₀ LL37 + химиопрепараты, мкМ	ИК ₅₀ NGF + химиопрепараты, мкМ
Доксорубин	227,0	375,5	172,6	657,1
Карбоплатин	244,1	1144,4	55,2	2847,8
Темозоломид	391,5	1313,4	1805,1	5855,2
Цисплатин	81,2	644,7	4,0	1167,0
Этопозид	11,5	27,1	0,6	36,4
NGF	0,0148			
LL-37	1,1			
PG-1	10,1			

Данные МТТ теста (таблица 3.7) показывают, что ИК₅₀ комбинаций LL-37 с доксорубином, карбоплатином, CSP и этопозидом был ниже (в 1,3, 4,4, 20,3 и 18,5 раз соответственно), чем ИК₅₀ химиопрепаратов, что говорит о более сильном цитотоксическом действии комбинаций LL-37 с доксорубином, карбоплатином, CSP и этопозидом в сравнении с обособленным действием химиопрепаратов на клетки глиомы С6. Вместе с тем, только ИК₅₀ комбинации LL-37 с этопозидом оказалась ниже в 1,7 раза, чем ИК₅₀ LL-37. Эта комбинация

обладала наибольшей цитотоксической активностью по сравнению с остальными сочетаниями в отношении клеток глиомы С6.

Значения $ИК_{50}$ комбинаций LL-37 с TMZ и PG-1, NGF со всеми химиопрепаратами оказались выше, чем $ИК_{50}$ химиопрепаратов. Это указывает на менее выраженную цитотоксическую активность комбинаций PG-1, NGF с выбранными химиопрепаратами и LL-37 с TMZ на клетках глиомы С6. Также $ИК_{50}$ комбинаций PG-1, NGF со всеми тестируемыми химиопрепаратами и LL-37 с доксорубицином, карбоплатином, TMZ, CSP были выше, чем $ИК_{50}$ PG-1, LL-37 и NGF.

Аналогичным образом были рассчитаны $ИК_{50}$ комбинаций PG-1, NGF и LL-37 с химиопрепаратами на клетках глиомы С6 по результатам теста с трипановым синим (данные не показаны).

Рассчитав $ИК_{50}$ химиопрепаратов, PG-1, LL-37, NGF и их комбинаций, оценивали по формуле 2.9 КИ и типы эффектов комбинаций (синергизм, антагонизм, аддитивность). КИ и варианты комбинационных взаимодействий PG-1, LL-37, NGF с химиопрепаратами по результатам МТТ теста в отношении клеток глиомы С6 представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8

Комбинационный индекс химиопрепаратов с NGF, LL-37, PG-1 при комбинированном действии на клетки глиомы С6 по результатам МТТ теста

Серия	PG1 + химиопрепараты,	LL37 + химиопрепараты	NGF + химиопрепараты
Доксорубицин	2,72 (сильный антагонизм)	5,57 (сильный антагонизм)	2,90 (сильный антагонизм)
Карбоплатин	0,11 (сильный синергизм)	6,90 (сильный антагонизм)	11,67 (сильный антагонизм)
Темозоломид	<i>1,0</i> (аддитивность)	13,3 (сильный антагонизм)	4,45 (сильный антагонизм)
Цисплатин	7,75 (сильный антагонизм)	1,53 (антагонизм)	1413,8 (очень сильный антагонизм)
Этопозид	2,41 (сильный антагонизм)	0,57 (синергизм)	4,44 (сильный антагонизм)

Примечание: жирным шрифтом и красным цветом обозначены синергетические эффекты комбинаций, курсивом и красным цветом – аддитивные эффекты.

Значения $КИ < 1$ в таблице 3.8 показывают, что синергизм был установлен только для комбинаций PG-1 с карбоплатином и LL-37 с этопозидом в результате действия на клетки глиомы С6. Аддитивность ($КИ = 1$) наблюдалась для комбинации PG-1 с TMZ. ИСД для комбинаций PG-1 с карбоплатином составил 2,9, а для LL-37 с этопозидом 119,8. Все остальные сочетания реагентов проявляли антагонизм ($КИ > 1$) по сравнению с обособленным применением химиопрепаратов и пептидов. Объяснением данного эффекта может быть экранирование молекул LL-37 и NGF молекулами химиопрепаратов, применяемых в высоких концентрациях, что мешает связыванию пептидов с мембраной клеток. Аналогичным образом

определяли значения КИ и варианты комбинационных взаимодействий пептидов и NGF с химиопрепаратами на клетках глиомы С6 по результатам теста с трипановым синим (данные не показаны).

Также на клетках С6 были оценены комбинированные эффекты пептидов PG-1, LL-37 друг с другом и с NGF по сравнению с обособленным действием пептидов и NGF при в дозах близких к ИК₅₀ при проведении МТТ и теста с трипановым синим (рисунки 3.10).

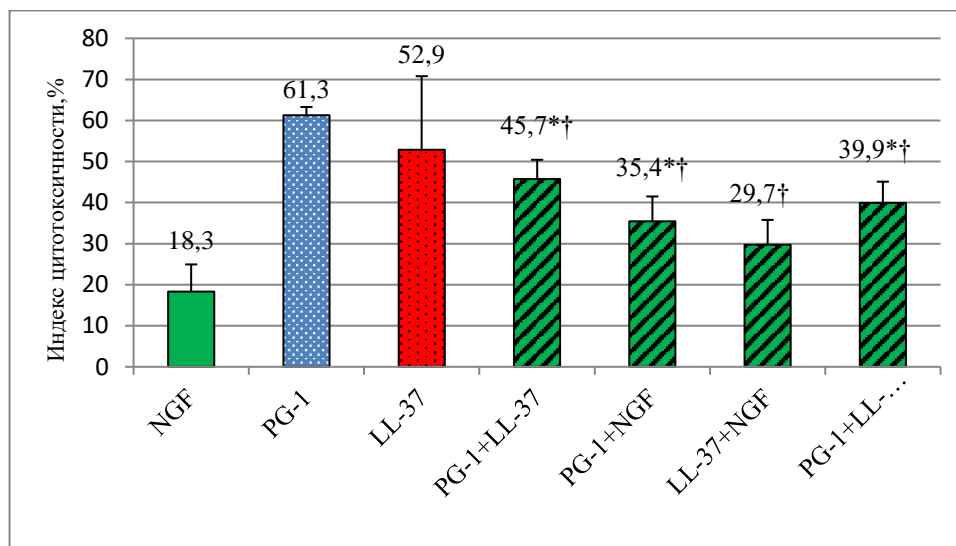


Рисунок 3.10. Действие *in vitro* комбинаций PG-1 с LL-37 и NGF на клетках глиомы С6 в МТТ тесте

Знаком * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия ИЦ комбинаций от ИЦ PG-1, † – статистически значимые ($p < 0,05$) отличия ИЦ комбинаций от ИЦ NGF

Результаты рисунка 3.10 показывают, что действие комбинаций PG-1 + LL-37, PG-1 + NGF и PG-1 + LL-37 + NGF было слабее ($p < 0,05$) по сравнению с действием PG-1. Эффекты комбинаций PG-1 + LL-37, LL-37 + NGF и PG-1 + LL-37 + NGF статистически значимо не отличались от ИЦ LL-37. Однако, действие PG-1 + NGF и PG-1 + LL-37 + NGF оказалась сильнее ($p < 0,05$), чем действие NGF. Аналогичные данные по действию комбинаций PG-1 с LL-37, PG-1 с NGF и PG-1 + LL-37 + NGF были изучены на клетках глиомы С6 по результатам теста с трипановым синим (данные не показаны).

3.2.2. Оценка цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетках глиомы U251

С целью определения цитотоксической противоопухолевой активности комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами в отношении клеток глиомы U251 их действие сравнивали по ИК₅₀ с обособленным действием химиопрепаратов и пептидов по результатам МТТ теста (таблицы 3.9) и теста с трипановым синим.

Таблица 3.9

Показатели ИК₅₀ химиопрепаратов, NGF, LL37, PG1 и их комбинаций при *in vitro* действии на клетки глиомы U251 в МТТ тесте

Серия	ИК ₅₀ реагентов, мкМ	ИК ₅₀ PG1 + химиопрепараты, мкМ	ИК ₅₀ LL37 + химиопрепараты, мкМ	ИК ₅₀ NGF + химиопрепараты, мкМ
Доксорубицин	1554,9	730,9	5265,5	600,5
Карбоплатин	3652,9	2938,9	3513,3	2880,6
Темозоломид	1725,7	9761,7	4007,0	16804,0
Цисплатин	371,5	237,9	86,9	207,4
Этопозид	25,9	17,0	17,9	13,7
NGF	0,00214			
LL-37	3,1			
PG-1	26,1			

Данные МТТ теста, представленные в таблице 3.9, показывают, что ИК₅₀ комбинаций PG-1 с доксорубицином (2,1 раза), карбоплатином (в 1,2 раза), CSP (в 1,6 раза) и этопозидом (в 1,5 раза), NGF с доксорубицином (в 2,6 раза), карбоплатином (в 1,3 раз), CSP (в 1,8 раза) и этопозидом (в 1,9 раза), LL-37 с CSP (в 4,3 раза) и LL-37 с этопозидом (в 1,5 раз) была ниже, чем ИК₅₀ химиопрепаратов, что свидетельствует о более выраженной цитотоксической активности этих комбинаций в сравнении с действием химиопрепаратов. Только ИК₅₀ комбинации PG-1 с этопозидом оказалась ниже в 1,5 раза, чем ИК₅₀ PG-1. Значения ИК₅₀ остальных сочетаний PG-1, LL-37, NGF с TMZ и LL-37 с доксорубицином было выше, чем ИК₅₀ данных химиопрепаратов, что указывает на более слабое цитотоксическое действие комбинаций по сравнению с действием химиопрепаратов на клетки глиомы U251 человека. Аналогичные результаты по изучению действия комбинаций PG-1 с LL-37, PG-1 с NGF и PG-1 + LL-37 + NGF на клетках глиомы C6 были выполнены с помощью теста с трипановым синим (данные не показаны). После определения ИК₅₀ химиопрепаратов, PG-1, LL-37, NGF и их комбинаций рассчитывали по формуле 2.9 КИ, по которому устанавливали типы эффектов комбинаций (синергизм, антагонизм, аддитивность), таблица 3.10.

Таблица 3.10

КИ комбинаций химиопрепаратов с NGF, LL-37, PG-1 при действии на клетки глиомы U251 в МТТ тесте

Серия	PG1 + химиопрепараты	LL37 + химиопрепараты	NGF + химиопрепараты
Доксорубицин	0,94 (аддитивность)	188,6 (очень сильный антагонизм)	2,42 (антагонизм)
Карбоплатин	1,46 (антагонизм)	4,31 (антагонизм)	2,69 (антагонизм)
Темозоломид	6,04 (антагонизм)	8,95 (антагонизм)	9,73 (сильный антагонизм)
Цисплатин	1,38 (антагонизм)	2,67 (антагонизм)	2,78 (антагонизм)
Этопозид	0,65 (синергизм)	1,85 (антагонизм)	2,34 (антагонизм)

Значения КИ, приведенные в таблице 3.10, показывают, что на клетках глиомы U251 только комбинация PG-1 с этопозидом проявляет синергизм (КИ=0,65) по результатам МТТ теста. ИСД для этой комбинации составил 41,2. Сочетание PG-1 с доксорубицином оказывает аддитивный эффект на глиому U251. Для остальных комбинаций был характерен антагонизм. Наиболее сильный антагонизм проявляет комбинация LL-37 с доксорубицином. Также комбинация PG-1 с этопозидом проявляет сильное синергитическое цитотоксическое действие (КИ=0,25) на клетках глиомы U251 в тесте с трипановым синим (данные не показаны).

Также на клетках U251 сравнивали комбинированные эффекты PG-1, LL-37, NGF между собой с действием PG-1, LL-37 и NGF в дозах близких к ИК₅₀ в МТТ (рисунок 3.11) и тесте с трипановым синим.

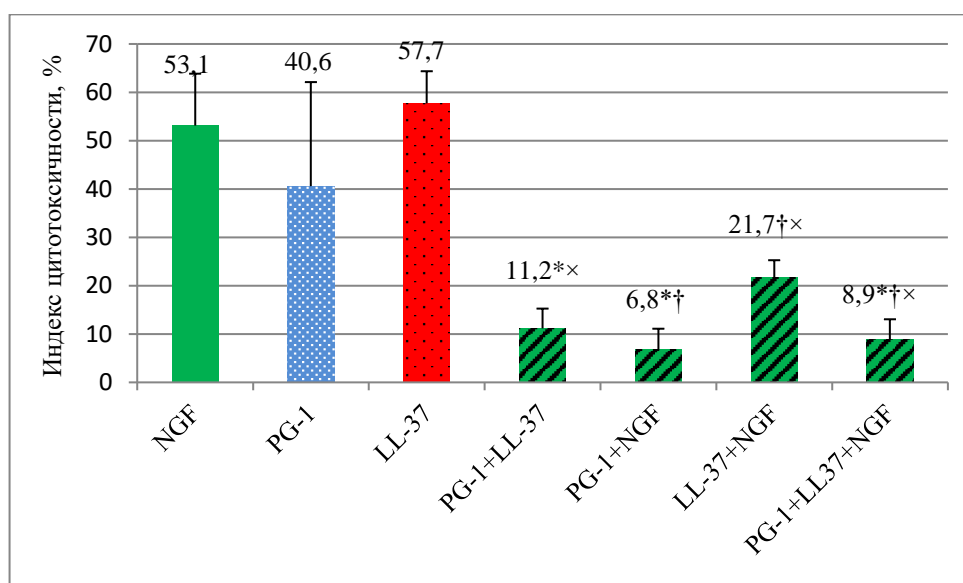


Рисунок 3.11. Действие *in vitro* комбинаций PG-1, LL-37 и с NGF на клетках глиомы U251 в МТТ тесте

Знаком * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия ИЦ комбинаций от ИЦ PG-1, † – статистически значимые ($p < 0,05$) отличия ИЦ комбинаций от ИЦ NGF, × – статистически значимые ($p < 0,05$) отличия ИЦ комбинаций от ИЦ LL-37

Результаты на рисунке 3.11 показывают, что действие комбинаций PG-1 + LL-37, PG-1 + NGF и PG-1 + LL-37 + NGF было слабее ($p < 0,05$), чем действие PG-1. Эффекты комбинаций PG-1 + LL-37, LL-37 + NGF и PG-1 + LL-37 + NGF статистически значимо ($p < 0,05$) были слабее, чем действие LL-37. Цитотоксическая активность PG-1 + NGF, LL-37 + NGF и PG-1 + LL-37 + NGF оказалась менее выраженной ($p < 0,05$), чем действие NGF. Интересно, что действие комбинаций PG-1 + LL-37, PG-1 + NGF и PG-1 + LL-37 + NGF на клетках глиомы U251 была ниже в 4,1, 5,2 и 3,4 раза соответственно, чем их действие на клетки глиомы С6. Это может свидетельствовать о большей резистентности клеток глиомы U251 человека к пептидам по сравнению с клетками С6 глиомы крысы. Аналогичные результаты по изучению действия

комбинаций PG-1 с LL-37, PG-1 с NGF и PG-1 + LL-37 + NGF в дозах близких к ИК₅₀ на клетках глиомы С6 были выполнены с помощью теста с трипановым синим (данные не показаны).

3.2.3. Комбинированное действие фактора роста нервов и химиопрепаратов на клетки пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека

На клетках ПА, АА, ГБ и МБ сравнивали активности комбинаций NGF с химиопрепаратами с обособленным действием NGF, для чего рассчитывали среднее значение ИЦ комбинаций NGF с химиопрепаратами (рисунки 3.12, 3.13, 3.14 и 3.15).

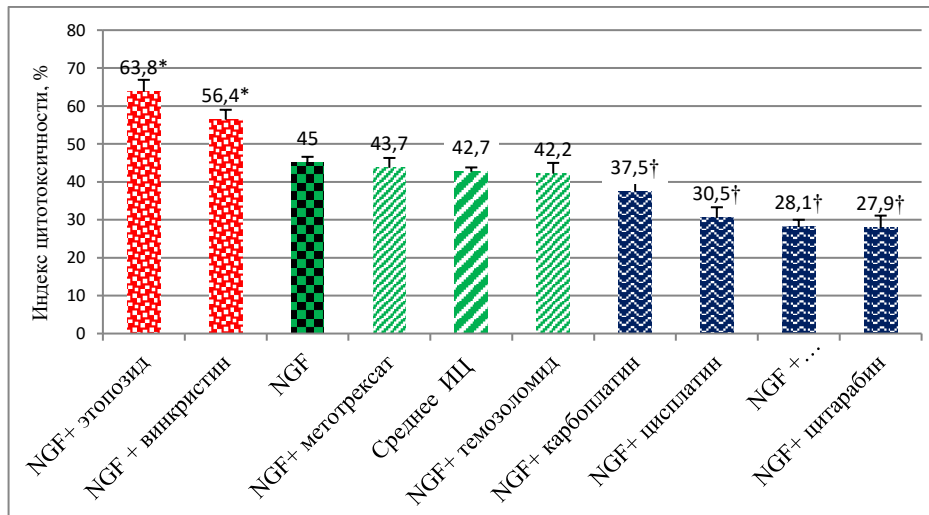


Рисунок 3.12. Действие *in vitro* комбинаций NGF с химиопрепаратами на клетки ПА

Здесь и на рисунках 3.13, 3.14, 3.15 красным цветом и знаком * обозначены комбинации, ИЦ которых превышает ($p < 0,05$) ИЦ NGF, зеленым цветом – комбинации, ИЦ которых не отличается от ИЦ NGF, знаком † и синим цветом – комбинации, ИЦ которых ниже ($p < 0,05$) ИЦ NGF

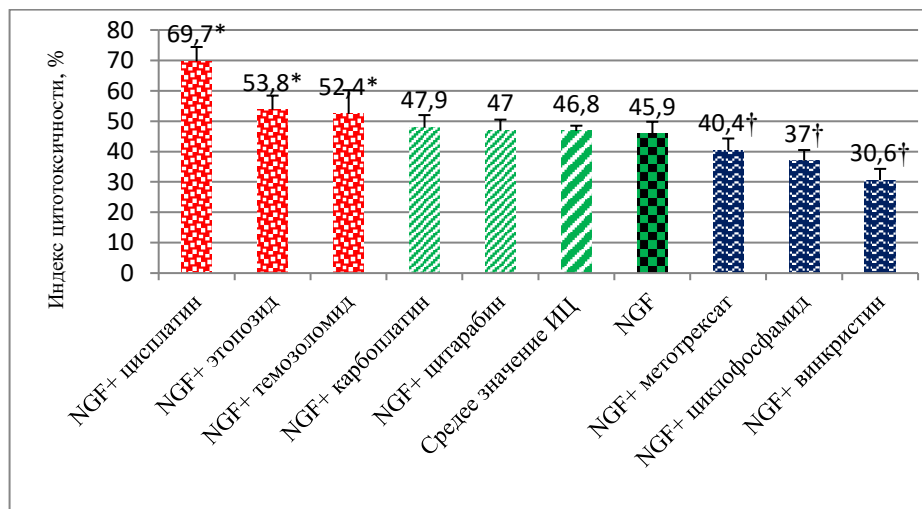


Рисунок 3.13. Действие *in vitro* комбинаций NGF с химиопрепаратами на клетки АА

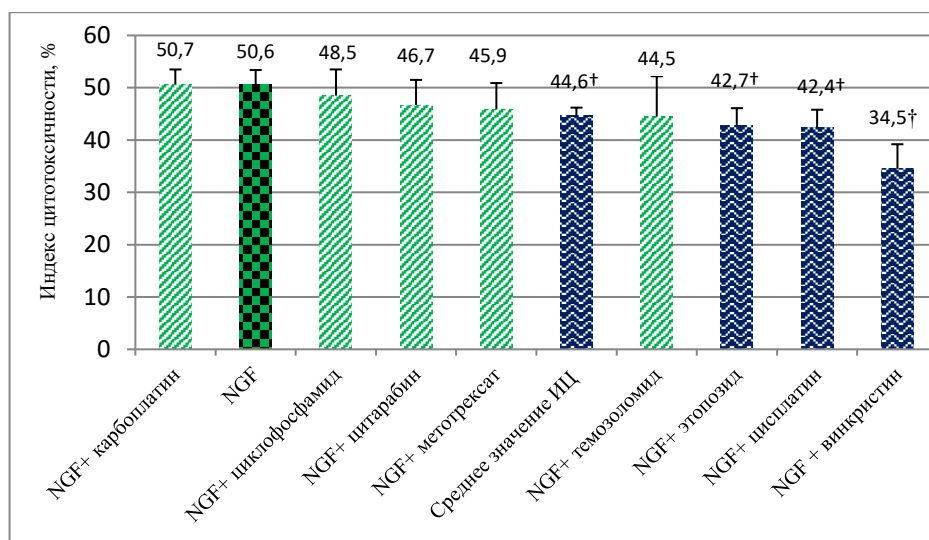


Рисунок 3.14. Действие *in vitro* комбинаций NGF с химиопрепаратами на клетки ГБ

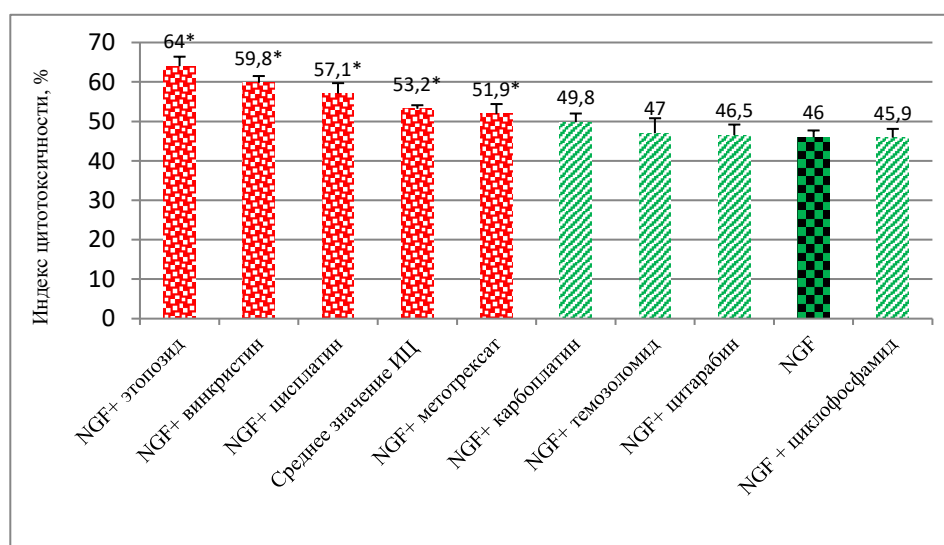


Рисунок 3.15. Действие *in vitro* комбинаций NGF с химиопрепаратами на клетки МБ

Данные рисунков 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 показывают, что комбинированное действие NGF с химиопрепаратами на клетки ПА, АА, ГБ и МБ оказывает *in vitro* по сравнению с обособленным действием NGF разнонаправленные эффекты:

- 1) Активность комбинаций NGF с химиопрепаратами статистически значимо не отличалась от действия NGF в отношении клеток ПА (ИЦ NGF = $45,0 \pm 1,6\%$, ИЦ комбинаций $42,7 \pm 1,1\%$, $p=0,73$) и АА (ИЦ NGF = $45,9 \pm 3,9\%$, ИЦ комбинаций = $46,8 \pm 1,7\%$, $p=0,1$);
- 2) Действие комбинаций NGF с химиопрепаратами ($44,6 \pm 1,6\%$) было статистически значимо ($p=0,005$) слабее, чем действие NGF ($50,6 \pm 2,8\%$) на клетках ГБ;
- 3) Действие комбинаций NGF с химиопрепаратами ($53,2 \pm 0,9\%$) было статистически значимо ($p=0,02$) сильнее, чем действие NGF ($46,0 \pm 1,7\%$) на клетках МБ.

Цитотоксическое действие комбинаций NGF с химиопрепаратами на клетки ПА, АА, ГБ и МБ зависит от гистологического типа опухоли, присутствия асинхронных популяций клеток по клеточному циклу, что определяется взаимодействиями разных сигнальных каскадов

3.3. Определение действия фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга человека

Настоящий раздел работы основан на данных исследований, показывающих высокую регенераторную способность NGF в отношении различных тканей организма к повреждающим действиям, в том числе наносимым химиопрепаратами [22]. Химиопрепараты и NGF тестировали на клетках нормальной нейроглиальной аутопсийной ткани мозга лиц, скоропостижно скончавшихся в результате состояний, не связанных с патологией мозга (рисунок 3.16). Чтобы оценить эффект NGF на клетки нейроглиальной ткани его действие сравнивали с эффектами химиопрепаратов *in vitro*.

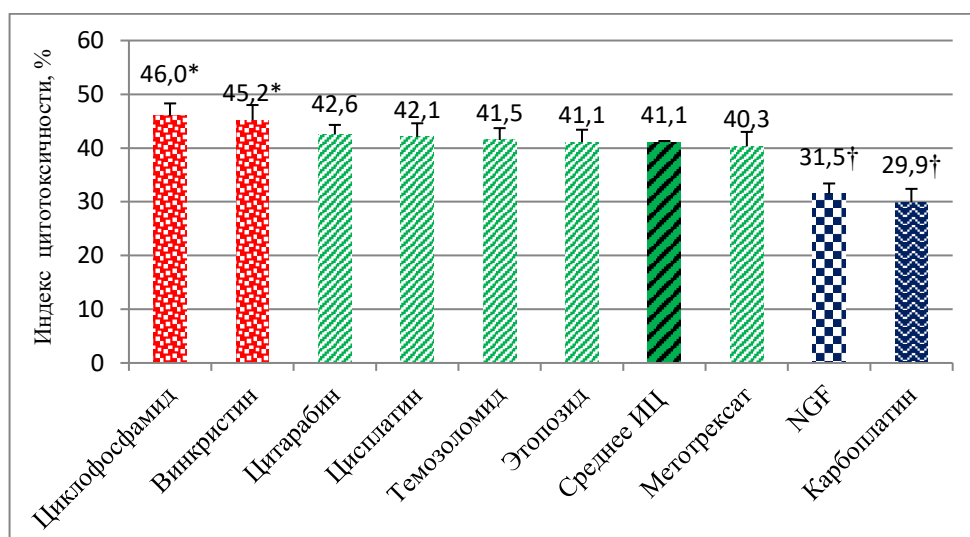


Рисунок 3.16. Действие NGF на клетки нейроглиальной ткани головного мозга *in vitro*

Красным цветом и знаком * обозначены химиопрепараты, ИЦ которых превышает ($p < 0,05$) среднее значение ИЦ химиопрепаратов, зеленым цветом – химиопрепараты, ИЦ которых не отличается от среднего значения ИЦ химиопрепаратов, знаком † и синим цветом – реагенты, ИЦ которых был ниже ($p < 0,05$) среднего значения ИЦ химиопрепаратов

Были выделены три группы препаратов: 1) химиопрепараты, ИЦ которых статистически значимо ($p < 0,05$) превышает среднее значение; 2) химиопрепараты, ИЦ которых статистически значимо не отличается от среднего значения ($p > 0,05$) 3) препараты, ИЦ которых был ниже среднего значения ($p < 0,05$). Данные рисунка 3.16 показывают, что ИЦ NGF ($31,5 \pm 1,9\%$) был статистически значимо ($p = 8,7 \times 10^{-18}$) ниже ИЦ химиопрепаратов ($41,1 \pm 1,7\%$) (за исключением ИЦ карбоплатина), что указывает на нейропротекторное действие NGF на клетки нейроглиальной ткани головного мозга.

Также изучали комбинированное *in vitro* действие NGF с химиопрепаратами на клетки нейроглиальной ткани мозга человека, сравнивая с активностью NGF, для чего рассчитывали средний ИЦ комбинаций (рисунок 3.17).

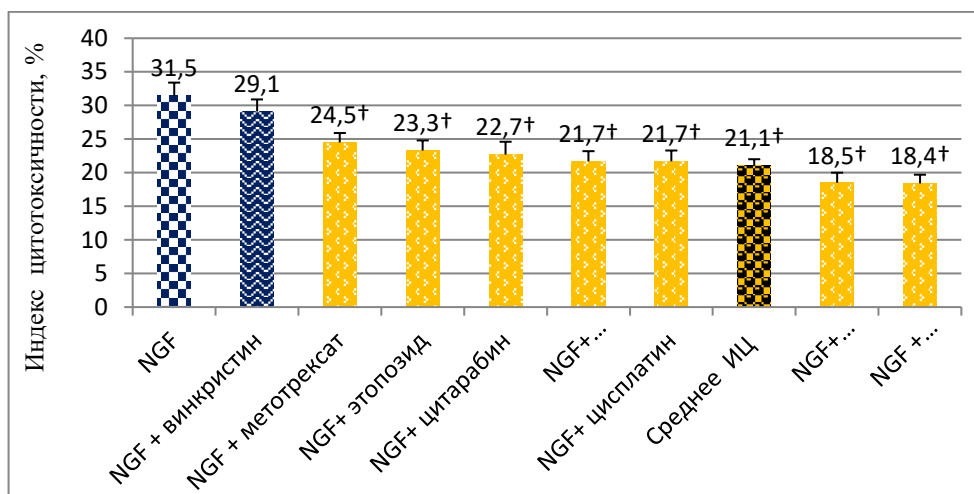


Рисунок 3.17. Действие комбинаций NGF с химиопрепаратами на клетки нейроглиальной ткани головного мозга *in vitro*

Синим цветом обозначены комбинации, ИЦ которых не отличался от ИЦ NGF, знаком † и желтым цветом – комбинации, ИЦ которых был ниже ($p < 0,05$) ИЦ NGF

На основании данных, представленных на рисунке 3.17, можно заключить, что 7 из 8 комбинаций обладают ($p = 1,43 \times 10^{-14}$) более слабым действием (ИЦ $21,1 \pm 0,9\%$) по сравнению с NGF (ИЦ $31,5 \pm 1,9\%$). Таким образом, действие NGF и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки ПА, АА, ГБ и МБ статистически значимо ($p < 0,05$) превышает, либо не отличается от действия химиопрепаратов (таблица 3.11).

Таблица 3.11

Индекс цитотоксичности (%) химиопрепаратов, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами при действии на клетки ПА, АА, ГБ, МБ и нейроглиальную ткань мозга человека

Тип ткани	Индекс цитотоксичности, %				
	химиопрепарата	знак	NGF, %	знак	NGF + химиопрепараты, %
Пилоцитарная астроцитома	45,4±0,03	=	45,0 ± 1,6	=	42,7±1,1
Анапластическая астроцитома	41,8 ± 0,1	=	45,9 ± 3,9	=	46,8±1,7
Глиобластома	40,7± 0,3	<	50,6 ± 2,8 (*)	>	44,6±1,6 (^)
Медуллобластома	38,4±0,08	<	46,0 ± 1,7 (*)	<	53,2±0,9 (^)
Нейроглиальная ткань	41,1±1,7%	>	31,5±1,9% (*)	>	21,1±0,9% (^)

Примечание: символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия ИЦ NGF от химиопрепаратов, символом ^ обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия ИЦ комбинаций NGF с химиопрепаратами от обособленного действия NGF

Из данных таблицы 3.11 можно заключить, что комбинированное применение NGF с химиопрепаратами позволяет снизить дозу химиопрепарата, при сохранении цитотоксического эффекта в отношении клеток ПА, АА, ГБ и МБ при протекторном действии на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга. Следовательно, наиболее предпочтительно в качестве лекарственных препаратов для дальнейших исследований *in vivo* выглядят комбинации NGF с химиопрепаратами, поскольку их цитотоксичность в отношении клеток нейроглиальной ткани значительно ниже ($p=1,4 \times 10^{-14}$) по сравнению с химиопрепаратами и NGF.

3.4. Изучение типов гибели клеток интракраниальных опухолей при действии фактора роста нервов, протегрина-1 и их комбинаций с химиопрепаратами

3.4.1. Изучение типов гибели клеток глиомы U251 при действии протегрина-1, этопозиды и их комбинации

Автором установлено, что комбинация PG-1 с этопозидом оказывает синергетическое цитотоксическое действие на клетки глиомы U251 (таблицы 3.9, 3.10). С целью того, чтобы установить по какому типу гибнут клетки глиомы при действии данной комбинации, автор с помощью проточной цитометрии исследовал связывание флуоресцентных ДНК красителей PI и YO-PRO-1 с клетками, предварительно обработанных в течение 24 ч этопозидом, PG-1 и их комбинацией (рисунок 3.18).

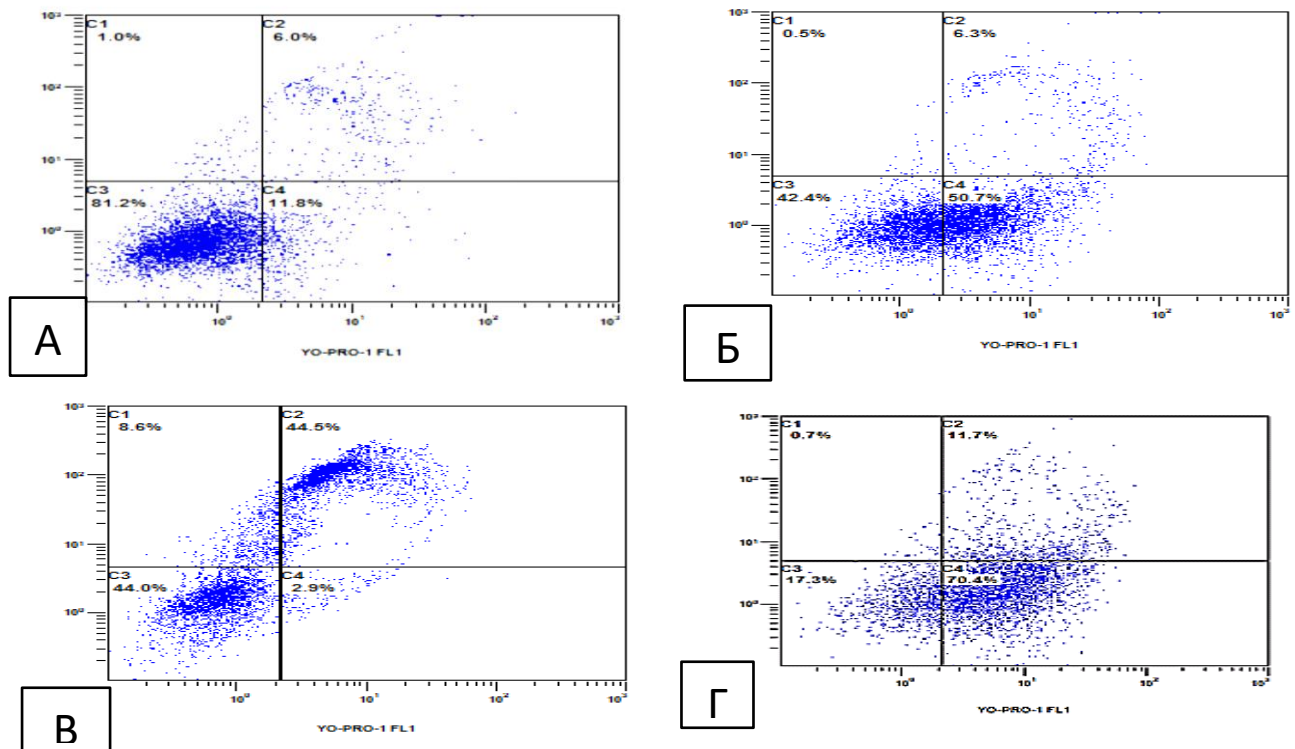


Рисунок 3.18. Проточно-цитометрический анализ типов гибели клеток глиомы U251 человека с помощью красителей PI и YO-PRO-1 при односуточном *in vitro* действии этопозиды (Б), PG-1 (В) и их комбинации (Г) в сравнении с контролем (А). В квадратах C3 – живые клетки, C1 и C2 – поздний апоптоз или некроз, C4 – ранний апоптоз

Как следует из данных на рисунке 3.18 после 24 ч действия этопозидом $50,7 \pm 5,2\%$ клеток глиомы U251 гибнут по типу апоптоза ($p < 0,0001$) и $6,3 \pm 2,0\%$ клеток гибнут по типу некроза. При 24 ч действии PG-1 $53,1 \pm 2,8\%$ клеток глиомы U251 гибнут по пути некроза ($p < 0,0001$). При действии комбинации PG-1 с этопозидом $70,4 \pm 11,4\%$ клеток глиомы U251 гибнут по типу апоптоза ($p < 0,0001$) и $12,4 \pm 4,7\%$ – по типу некроза ($p < 0,0054$).

Таким образом, комбинация PG-1 с этопозидом оказывает синергетический эффект на гибель клеток глиомы U251 за счет повышения ($p < 0,0001$) доли клеток, погибших по пути апоптоза и некроза по сравнению с действием этопозидом и PG-1 соответственно.

Также с целью верификации гибели клеток глиомы U251 по типу апоптоза при односуточном действии этопозидом, PG-1 и комбинации PG-1 с этопозидом была изучена спектрофотометрически активность каспазы-3 в лизатах клеток (рисунок 3.19).

Данные рисунка 3.19, показывают, что при односуточном действии этопозидом наблюдается стимулирование активности каспазы-3 на 40% ($p = 0,036$) по сравнению с необработанными клетками глиомы U251 в контроле. В результате применения PG-1 и комбинации PG-1 с этопозидом статистически значимого изменения активности каспазы-3 в лизатах клеток не наблюдалось.

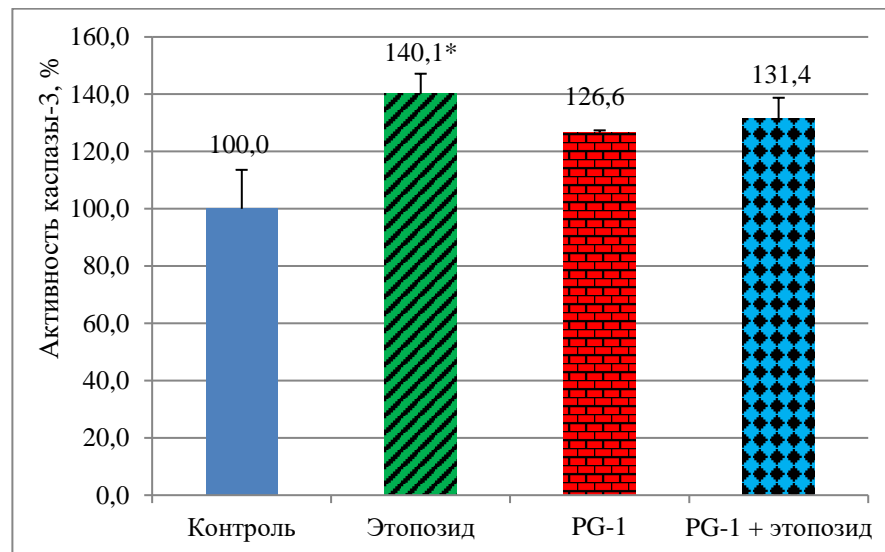


Рисунок 3.19. Активность каспазы-3 в лизатах клеток глиомы U251 при односуточном *in vitro* действии этопозидом, PG-1 и их комбинации в сравнении с контролем

3.4.3. Изучение типов гибели клеток пилоцитарной астроцитомы при действии цисплатина, темозоломида, фактора роста нервов и их комбинаций

Изучение изменений органелл в клетках ПА и МБ при обособленном и комбинированном действии химиопрепаратов и NGF позволяет исследовать механизмы действия химиопрепаратов при их комбинированном применении с NGF. В контрольных посевах 44% клеток ПА оставались жизнеспособными, тогда как $6,9\%$ погибало в результате апоптоза, $39,1\%$

– некроза и 10% – макропиноцитоза (рисунки 3.20, 3.21, 3.22). Субклеточная организация клеток ПА в контроле характеризовалась наличием неповрежденной плазмалеммы, крупного овального, центрально расположенного ядра с периферически локализованным конденсированным гетерохроматином и одним ядрышком.

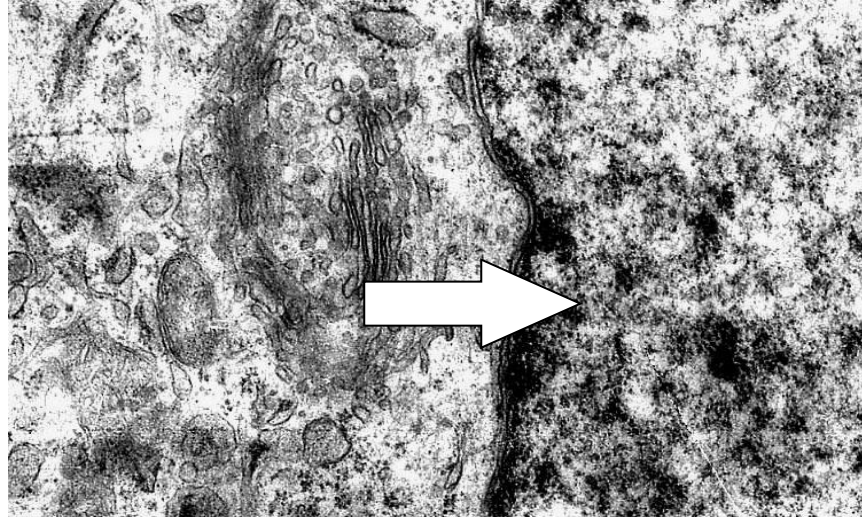


Рисунок 3.20. Микрофотография клетки ПА в контроле серии, ув. 7200. Стрелка указывает на фрагмент ядра, слева от которого видна цитоплазма с обычными органеллами

Одиночные, продолговатые митохондрии с типичной структурой матрикса и крист находились перинуклеарно. К особенностям ультраструктуры клеток, погибших по типу апоптоза, относили уменьшение ($p < 0,05$) ядер, увеличение в них степени конденсации гетерохроматина, редукцию ядрышек. В 3,4% клеток было отмечено пузырение «блеббинг» ядра (рисунок 3.21).

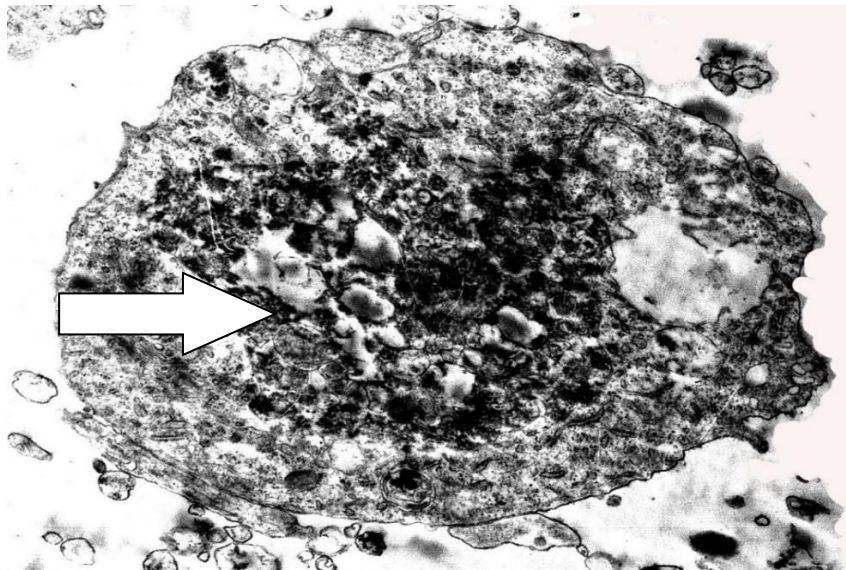


Рисунок 3.21. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу апоптоза, ув. 14400. Стрелкой обозначен блеббинг ядра и цитоплазмы при увеличении численности лизосом

Этому процессу предшествовало округление митохондрий, конденсация матрикса с хаотично расположенными кристами, перинуклеарная, а на поздних этапах – внутриядерная их

локализация [357]. В одной клетке обнаружены две полимембранные митохондрии с редукцией крист, что связано с отсутствием *e* и *g* субъединиц АТФ-азы [357]. В 2% образцов ПА наблюдали апоптотические тела, содержащие «осколки» ядер, липидные капли и вакуоли, а также гиперплазию цистерн ЭПР и комплексов Гольджи, локализующихся вблизи ядра. Наблюдалось появление липосом и участков лизиса цитоплазмы. Формирование последних сопряжено с возрастанием численности первичных липосом и пиносом, исчезновением крупных пиноцитарных пузырьков. Картина апоптоза ПА включала сохранение целостности мембраны, как в интактных клетках контроля.

Исследователи [164] выделяют макропиноцитоз в качестве особой формы гибели. Макропиноцитоз автор наблюдал в 10% клеток (рисунок 3.22). При данном типе гибели отмечается сохранение целостности мембраны, как в апоптотических клетках, но с появлением инвагинации и сегрегации ядра, как при некрозе. Конденсация хроматина варьировала в широком диапазоне: от отсутствия в 50% клеток до занимаемой им 55% площади других ядер. Ядрышки визуализировали в 25% клеток. Размеры липосом, вакуолей и крупных пиноцитарных пузырьков были увеличены ($p < 0,05$) по сравнению с неповрежденными клетками в контроле.

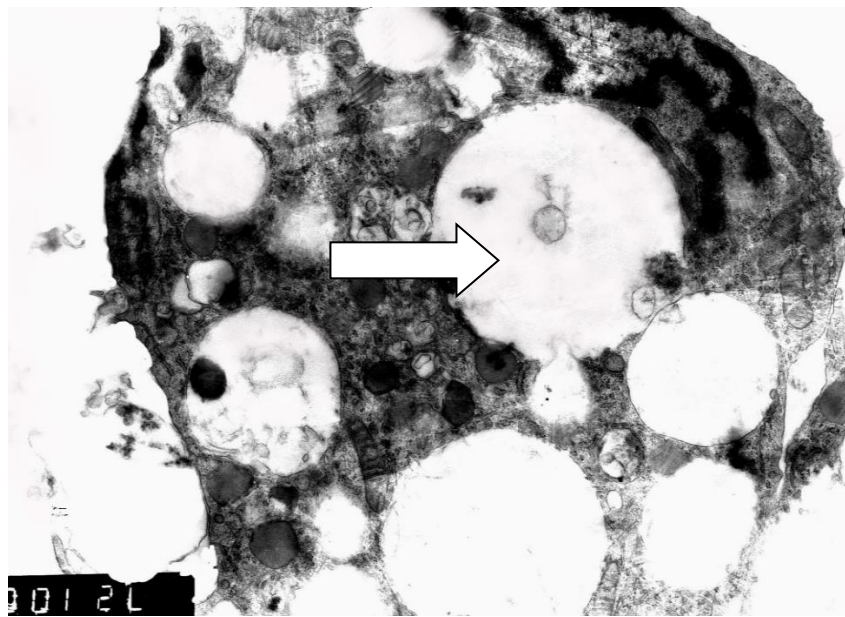


Рисунок 3.22. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу макропиноцитоза, ув. 7200

Стрелка показывает на макропиносомы

Действие NGF на клетки ПА стимулировало в 19% клеток их апоптоз (рисунок 3.23), в 57,1% – некроз (рисунок 3.24), в 9,4% – аутофагию (рисунок 3.25) и в 14,5% – смешанный тип гибели (рисунок 3.26). Особенности клеток ПА, погибшими по типу апоптоза в результате применения NGF, являлись такие как: увеличение степени конденсации хроматина ядер, уменьшение митохондрий, областей, занятых липидными каплями, вакуолями и первичными лизосомами.

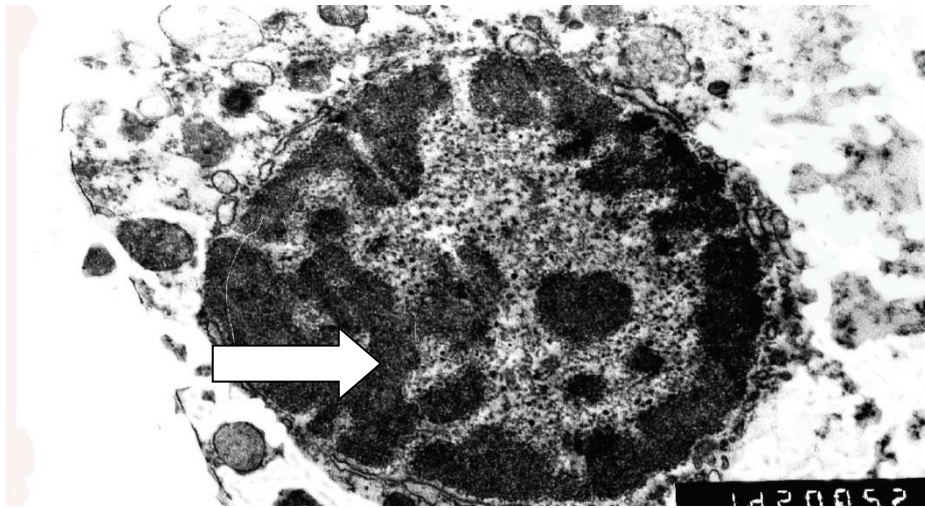


Рисунок 3.23 Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу апоптоза при действии NGF ($8,8 \times 10^{-9}$ М) в течение одних суток *in vitro*, ув. 14500. Стрелкой указано крупное ядро. Эти изменения вместе с отсутствием крупных форм данных везикул, цистерн ЭПР, комплексов Гольджи и участков цитолиза отражают затухание процессов лизиса, эндо-, транс- и экзоцитоза [375]. В 4,7% клеток наблюдали формирование апоптотических тел.

Отличительным признаком ультраструктуры клеток ПА, погибших по типу некроза (рисунок 3.24), являлся тотальный лизис цитоплазмы, ядер, митохондрий, вакуолей, цистерн ЭПР и комплексов Гольджи.

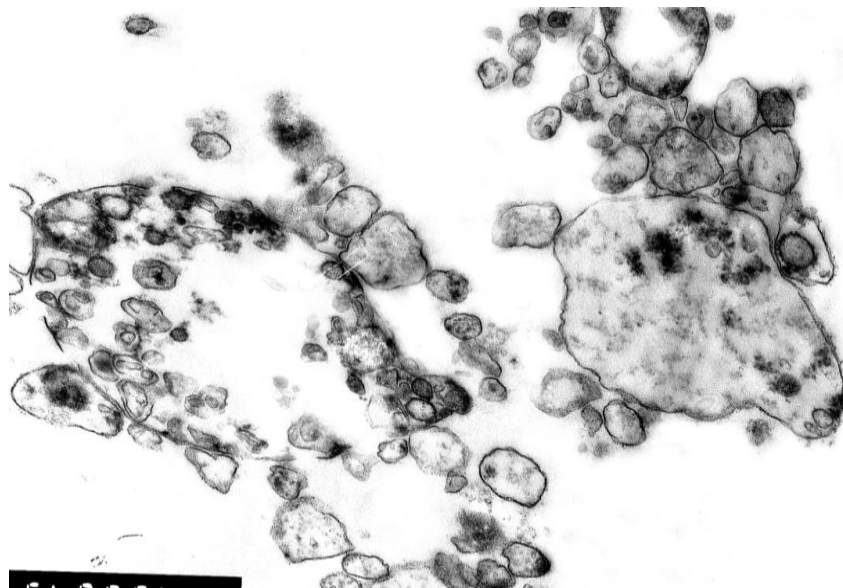


Рисунок 3.24. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при действии NGF ($8,8 \times 10^{-9}$ М) *in vitro*, ув. 14500. Стрелкой показана тотальная деструкция цитоплазмы при наличии многочисленных везикул.

В клетках ПА, погибших по типу аутофагии при использовании NGF (рисунок 3.25) наблюдалась полная деструкция хроматина ядра и 67,8% площади цитоплазмы клетки, снижение показателей ядерно-цитоплазматического соотношения.

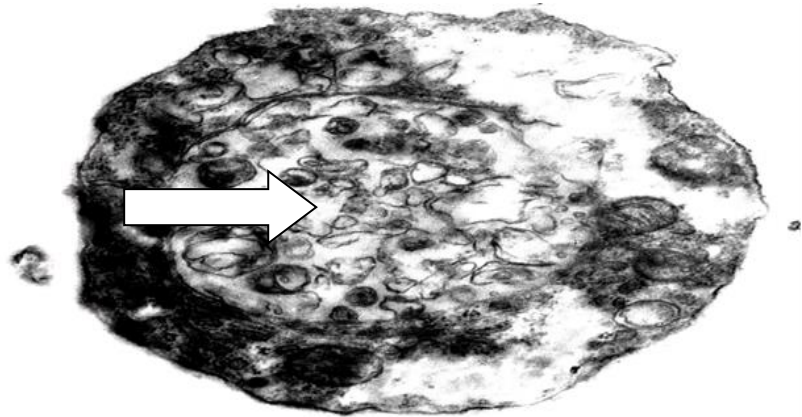


Рисунок 3.25. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу аутофагии при действии NGF ($8,8 \times 10^{-9}$ М) *in vitro*, ув. 14500. Стрелка указывает на лизис ядерного хроматина, а ядро вместе с измененной цитоплазмой превращено в крупную аутофагосому

Появлялись двухмембранные аутофагосомы, сливающиеся с первичными и вторичными лизосомами. Митохондрии имели округлую и эллипсоидную формы, прозрачный матрикс вследствие частичного или полного кристоллизиса и локализовались перинуклеарно. Сходная картина описана исследователями [164] на DAOY-клетках МБ человека в результате применения NGF и экспрессии TrkA рецепторов, стимулирующих образование аутофагосом. В литературе отмечается отрицательное значение аутофагии, которая является причиной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, усиливая их пролиферацию и выживание за счет блокады апоптоза и активации гуанидинтрифосфатаз – ГТФаз, Р13К, транскрипционного фактора E2F, Bcl-2 и онкогенов *PTEN*, *MYC* [227, 239].

К отличительным признакам гибели по смешанному типу клеток ПА при нанесении NGF (рисунок 3.26) относили повышение до 92,7% степени конденсации хроматина ядра и присутствие мелких, прозрачных кластриновых везикул.

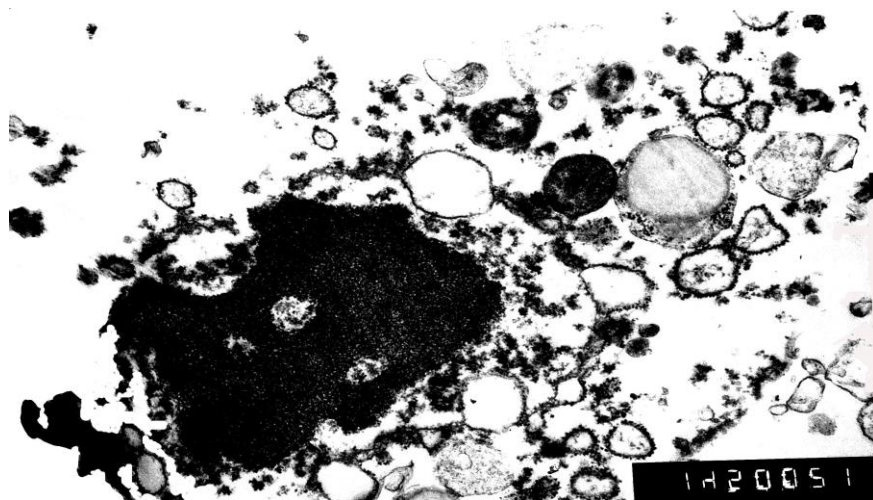


Рисунок 3.26. Микрофотография клетки ПА, погибшей по смешанному типу при действии NGF ($8,8 \times 10^{-9}$ М) *in vitro*, ув. 14500

Действие CSP на клетки ПА индуцирует их гибель по типу апоптоза в 32% электроннограмм, некрозу – в 60% и смешанному типу – в 8% клеток. К ультраструктурным особенностям клеток ПА, погибшим по типу апоптоза относили высокую степень конденсации хроматина ядра, что было обусловлено частичной его фрагментацией [376] с накоплением одно- и двухнитевидных разрывов ДНК [377]. Дислокацию ядер к полюсам отмечали в 12% клеток она была связана с модификациями внутриклеточного цитоскелета при нанесении CSP на клетки глиомы С6 [376]. Наблюдали уменьшение митохондрий, липидных капель, двухмембранных везикул по сравнению с клетками, погибшими по типу апоптоза в контроле. Деструкция цитоплазмы увеличивалась по отношению к клеткам, погибшим по типу апоптоза в контроле.

Отличительным признаком некроза клеток ПА при действии CSP (рисунок 3.27), служила редукция степени конденсированного гетерохроматина ядра по сравнению с неповрежденными клетками в контрольной серии. Отмечался широкий спектр изменений формы митохондрий (округлой, изогнутой, продолговатой и т.д.) с просветленным матриксом. Наблюдали увеличение площадей, занятых вторичными лизосомами и снижение площади измененных по форме, сегрегированных ядер и липидных капель.

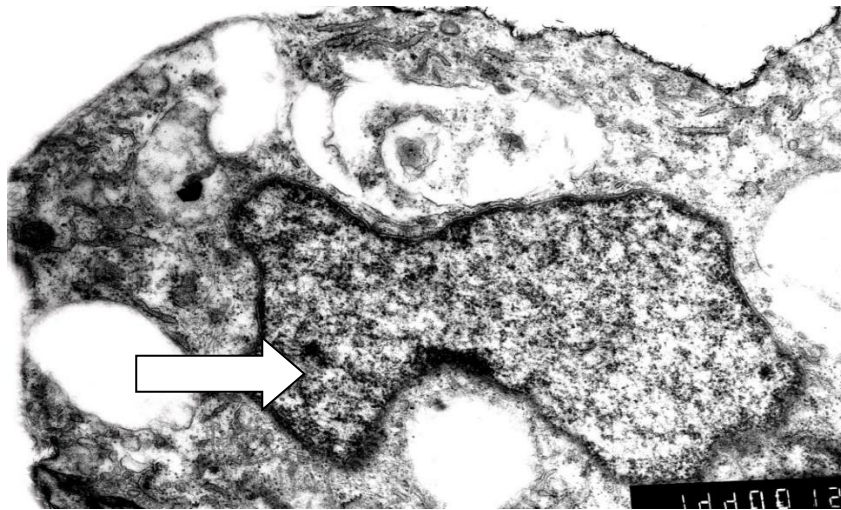


Рисунок 3.27. Микрофотография клетки ПА погибшей по типу некроза при действии CSP ($3,33 \times 10^{-6}$ М) *in vitro*, ув. 14400. Стрелка показывает на гипоконденсацию хроматина ядра неправильной формы

К особенностям ультраструктуры погибших по смешанному типу клеток ПА под действием CSP, относили повышение степени конденсации хроматина до 100% и областей первичных лизосом, липидных капель, вакуолей и цитолиза. Отмечали сокращение площадей смещенных к периферии клеток, измененных по форме ядер, деградацию ядрышек. Митохондрии с просветленным матриксом и кристолизисом были дистанцированы от них.

В результате действия комбинации NGF с CSP ($3,33 \times 10^{-7} \text{M}$) наблюдали гибель клеток ПА по типу некроза – в 85,7% электроннограмм (рисунок 3.28), смешанному типу – в 9,5% и апоптоза – в 4,7%. К особенностям ультраструктуры апоптотических клеток ПА при комбинированном действии NGF с CSP относили гиперконденсацию до 92,8% хроматина ядра по сравнению с клетками, обработанных химиопрепаратом и NGF, отсутствие кариорексиса и разрывов нуклеолеммы. В результате действия комбинации NGF с CSP на ультраструктурном уровне констатировали признаки некроза клеток ПА (рисунок 3.28): смещение ядер с мелкозернистым и гипоконденсированным хроматином и распадом ядрышек к периферии клетки, что указывает на нарушения цитоскелета в цитоплазме [376]. Наблюдали уменьшение ($p < 0,05$) областей округлой или продолговатой формы митохондрий, имеющих прозрачный матрикс с кристоллизисом. присутствие крупных липидных капель и клеточного детрита. Увеличивались области, занятые вакуолями, лизосомами, цитолизисом и липидными каплями. Численность последних колебалась от одной гигантской до нескольких десятков на клетку.

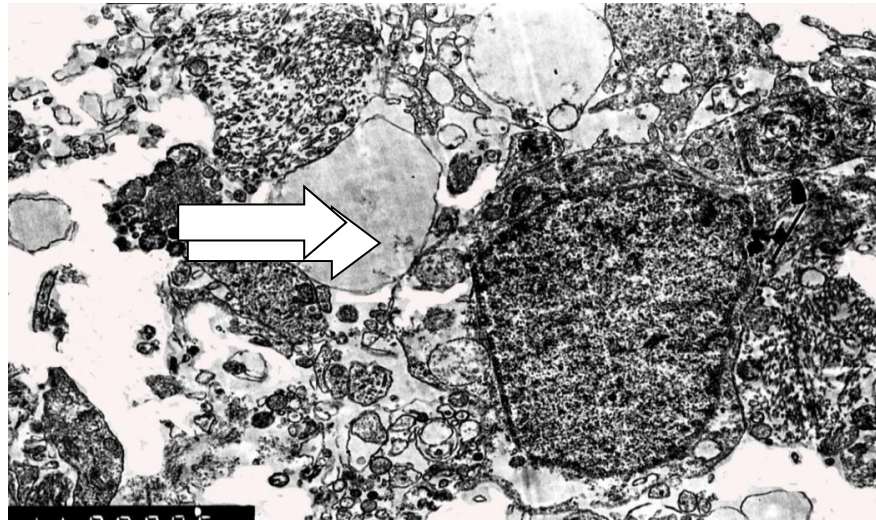


Рисунок 3.28. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при действии комбинации NGF ($8,8 \times 10^{-9} \text{M}$) с CSP ($3,33 \times 10^{-7} \text{M}$) *in vitro*, ув. 9800.

Стрелка указывает на липидные капли

Ультраструктурным признаком погибших по смешанному типу клеток ПА при использовании NGF с CSP являлась редукция показателей ЯЦС. Остальные изменения: уменьшение площадей ядер с 54%-ной конденсацией гетерохроматина, электронно-плотных митохондрий, деградация ядрышек – не отличались от таковых в клетках ПА, погибших по типу апоптоза при действии NGF. Как в клетках, погибших по смешанному типу при применении CSP, была выявлена гиперплазия цистерн ЭПР.

В результате действия TMZ на клетки ПА наблюдали их гибель по типу некроза – в 80% электроннограмм и смешанному типу – в 20%. К ультраструктурным особенностям клеток ПА,

погибших по типу некроза (рисунок 3.29) относили редукцию площадей ядер с гипоконденсированным хроматином и показателей ЯЦС.

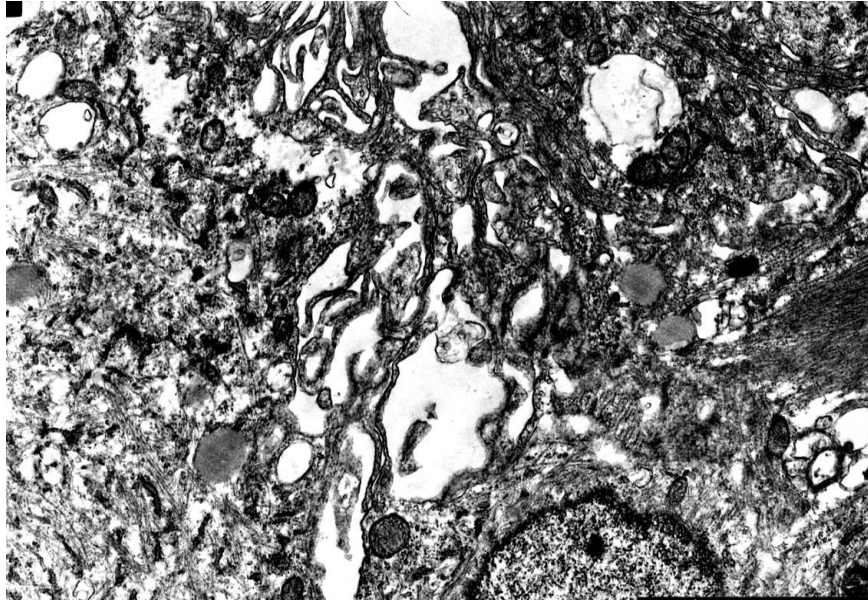


Рисунок 3.29. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при действии TMZ ($10,3 \times 10^{-6} \text{M}$) *in vitro*, ув. 10000

К ультраструктурным признакам погибших по смешанному типу клеток ПА при использовании TMZ относили снижение площадей, занятых электронно-плотными митохондриями с неправильным расположением крист, увеличение численности первичных лизосом, что указывает на интенсивно протекающий процесс фагоцитоза.

При применении комбинации NGF с TMZ ($1,03 \times 10^{-7} \text{M}$) отмечали гибель клеток ПА по типу некроза – в 75% и смешанному типу – в 25% электроннограмм (рисунок 3.30).

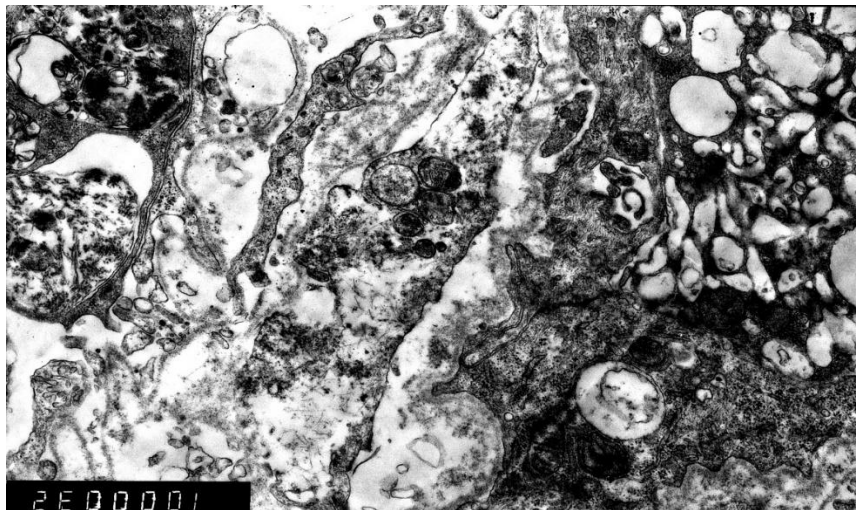


Рисунок 3.30. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при действии комбинации NGF ($8,8 \times 10^{-9} \text{M}$) с TMZ ($10,3 \times 10^{-7} \text{M}$) *in vitro*, ув. 10000

Ультраструктурными особенностями клеток ПА, погибших по типу некроза в результате применения комбинации NGF с TMZ (рисунок 3.30) было снижение показателей

ЯЦС до 9% и площадей занятых митохондриями с лизированным матриксом и кристами, липидными каплями. Области плазмолизиса цитоплазмы и вакуолей имели промежуточные значения среди некротических клеток в контроле и при действии TMZ.

К ультраструктурным признакам клеток ПА, погибших по смешанному типу при использовании комбинации NGF + TMZ, относили наличие относительно крупного ядра неправильной формы с конденсированным гетерохроматином, по площади меньшего, чем в интактных клетках контроля и крупнее, чем в некротических клетках при обособленном и комбинированном действии соответственно TMZ и NGF. Наблюдали укрупнение областей лизиса цитоплазмы, чем в некротических клетках при сочетанном применении NGF и TMZ и погибших по смешанному типу при обособленном действии TMZ.

Численность клеток ПА, погибших по разным типам в результате применения CSP, TMZ, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами представлена в таблице 3.12.

Таблица 3.12

Интенсивность спонтанных и индуцированных типов гибели клеток ПА при действии CSP, TMZ, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами *in vitro*

Тип гибели	Процент погибших клеток, %					
	серия эксперимента					
	контроль	CSP	NGF + CSP	TMZ	NGF + TMZ	NGF
Апоптоз	6,9 ± 0,5(#)	32,0 ± 1,9 (#^√)	4,7 ± 0,9 (†°#^)	–	–	19,0 ± 2,6 (#√)
Некроз	39,1 ± 2,6(*)	60,0 ± 1,1(*^√)	85,8 ± 1,4 (*†°#^√)	80,0 ± 6,4 (*^√)	75,0 ± 4,8 (*°#^√)	57,1 ± 3,3 (*^√)
Смешанный тип	–	8,0 ± 0,8 (*#√)	9,5 ± 1,3 (#√)	20,0 ± 6,4 (*#√)	25,0 ± 4,8 (°#√)	14,5 ± 1,7 (#√)

Примечание: знаками † и ° обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия комбинированного от обособленного действия химиопрепарата и NGF соответственно. Символы *, # и ^ указывают на статистически значимые ($p < 0,05$) отличия численности клеток от погибших по типам апоптоза, некроза или смешанного соответственно при обособленном или комбинированном действии каждого реагента; √ – обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия в численности клеток, погибших по определенному типу гибели при применении химиопрепаратов, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами от гибели клеток по данному типу в контроле

Таким образом, в результате действия CSP наблюдается усиление ($p < 0,05$) гибели клеток ПА по типам некроза и апоптоза по сравнению с контролем, также 8% клеток гибнет по смешанному типу (таблица 3.12). При применении комбинации NGF + CSP наблюдается снижение ($p < 0,05$) количества клеток, погибших по типу апоптоза по сравнению с клетками, при использовании CSP и NGF, но увеличение ($p < 0,05$) до 85,8% количества клеток, погибших по типу некроза. При действии TMZ на клетки ПА увеличивается ($p < 0,05$) их количество,

погибших по типу некроза по сравнению с контролем, причем 20% клеток гибнет по смешанному типу. В результате действия NGF повышается ($p < 0,05$) численность клеток ПА, погибших по типам апоптоза и некроза по сравнению с контролем, и 14,5% клеток гибнет по смешанному типу. При нанесении комбинации NGF с TMZ наблюдается увеличение ($p < 0,05$) гибели клеток по типу некроза по сравнению с контролем и при применении NGF. В результате действия этой же комбинации отмечается повышение ($p < 0,05$) гибели клеток ПА по смешанному типу по сравнению с NGF, но статистически значимо не изменяется их количество при обособленном применении химиопрепарата.

3.4.4. Изучение типов гибели клеток медуллобластомы при действии цисплатина, темозоломида, фактора роста нервов и их комбинаций

Клетки МБ с неповрежденной ультраструктурой встречались в 74,8% электроннограмм контрольной серии, остальные погибали по типам апоптоза – в 9,9%, некроза – в 7,6% и смешанному типу – в 7,6%. К особенностям ультраструктуры жизнеспособных клеток МБ (рисунок 3.31) по сравнению с клетками ПА, были отнесены: удлинённые веретеновидные ядра, не содержащие гетерохроматина, имеющие до пяти крупных ядрышек, что свидетельствует об интенсивно протекающем биосинтезе белка.

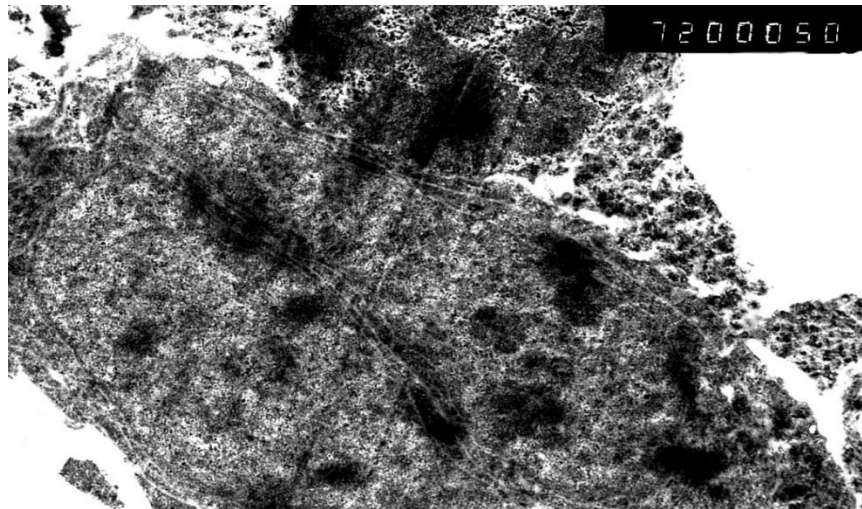


Рисунок 3.31. Микрофотография клеток МБ в контрольной серии, ув. 7200

Автор отмечал повышение ($p < 0,05$) до $78,2 \pm 2,3\%$ показателей ЯЦС по сравнению с клетками ПА ($54,4 \pm 1,8\%$). Были выявлены липидные капли и области лизиса цитоплазмы. Отсутствовали вакуоли, мелкие и крупные пиносомы, цистерны ЭПР и комплексы Гольджи.

Апоптотические клетки МБ в контроле располагались группами по 3-5, формируя розетки Хомера-Райта [378]. Отличительным признаком их ультраструктуры являлось уменьшение областей лишенных нуклеолеммы и округлых ядер, численности ядрышек при усилении степени конденсации хроматина (рисунок 3.32).

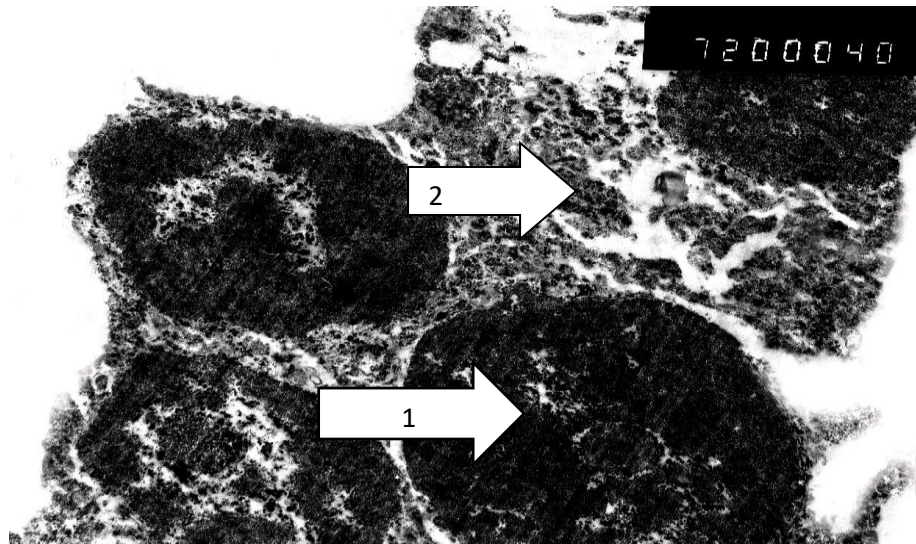


Рисунок 3.32. Микрофотография группы клеток МБ, формирующих розетку Хомера-Райта и погибших по типу апоптоза, ув. 7200. Стрелками показаны гиперконденсированные ядра (1) и деструкция плазмолеммы (2)

В 11% клеток неправильной формы ядра имели глубокие инвагинации, сочетающиеся с кариорексисом, а на финальном этапе – кариолизисом. Отмечали наличие липидных капель вблизи или в самом ядре, появление вакуолей и первичных пиноцитарных пузырьков. Возрастала площадь везикул по сравнению с жизнеспособными клетками в контроле.

Отличительным признаком некроза МБ являлся мелкоглыбчатый, гипоконденсированный эухроматин неправильной формы ядер с выпячиваниями, инвагинациями и кариорексисом. Вблизи ядер и в них, в цитоплазме локализовались липидные капли (рисунок 3.33).

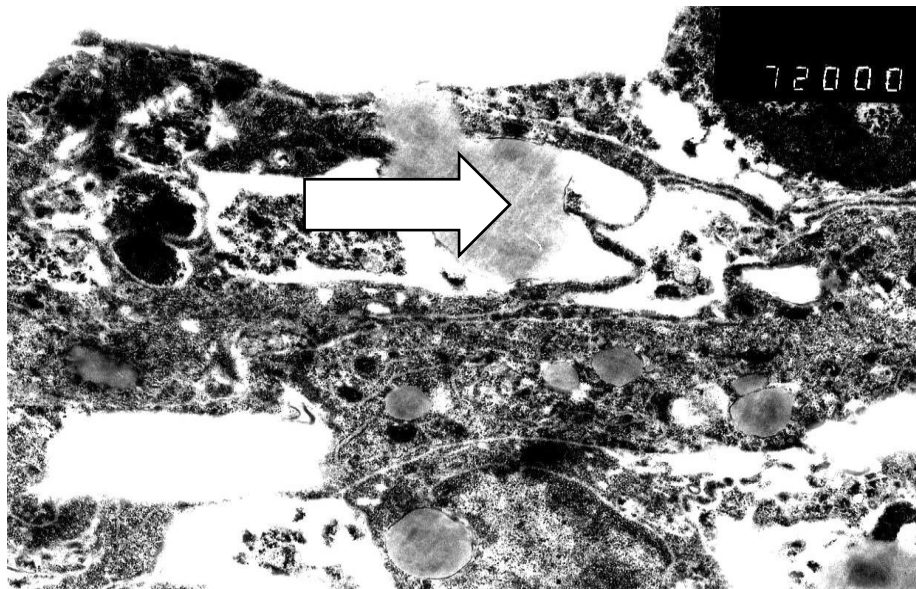


Рисунок 3.33. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу некроза в контроле, ув. 7200
Стрелкой обозначены липидные капли в цитоплазме

Визуализировали области, занятые рибосомами и волокнистыми структурами, которые указывают на фибриллярный тип некроза. Возрастали площади липидных капель относительно

интактных клеток контроля. Наблюдали уменьшение ($p < 0,05$) площадей вакуолей, везикул, лишённого нуклеолеммы ядра и численности ядрышек в сравнении с апоптотическими клетками. К особенностям клеток МБ, погибшим по смешанному типу, принадлежали 100%-ная степень гиперконденсации хроматина ядра и деградация ядрышек. Не наблюдали митохондрий, уменьшались относительно некротических клеток площади липидных капель и первичных лизосом. Отмечали увеличение площадей рибосом, лизосом, цитоллизиса и вакуолей относительно погибших по типу некроза клеток контроля. Как в интактных клетках контроля, не наблюдали первичных пиносом.

В результате действия NGF на клетки МБ наблюдали гибель в 9,2% электроннограмм по типу апоптоза, в 69,3% электроннограмм – по типу некроза (рисунок 3.34) и в 21,5% – по смешанному типу (рисунок 3.35). Отличительными субклеточными признаками клеток МБ, погибших по типу апоптоза при применении NGF, являлось уменьшение площадей ядрышек и цитоллизиса относительно погибших по типам апоптоза клеток в контроле. Наблюдали гиперплазию цистерн ЭПР, отсутствие липидных капель и появление участков полирибосом, что указывает на интенсификацию биосинтеза, транспорта, посттрансляционных модификаций белков. Отсутствуют митохондрии, вторичные лизосомы, первичные и крупные пиносомы относительно погибших по смешанному типу клеток в контроле.

Особенностью клеток МБ, погибших по типу некроза в результате действия NGF (рисунок 3.34), являлась более сильная ($p < 0,05$) редукция размеров ядер, митохондрий и липидных капель по сравнению с клетками в контроле и погибших по типу некроза.

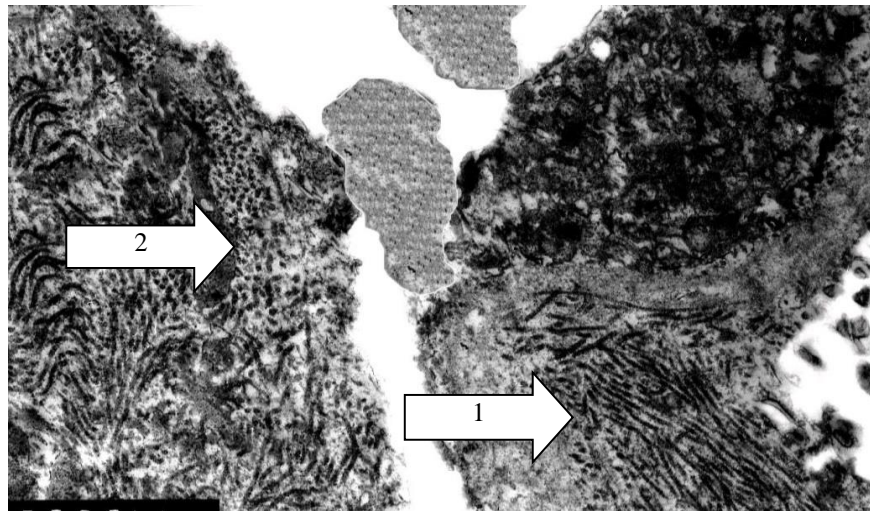


Рисунок 3.34. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу некроза при действии NGF ($8,8 \times 10^{-9} \text{M}$) *in vitro*, ув. 14000. Стрелками показаны: микрофиламенты (1) и полирибосомы (2)

Автор наблюдал увеличение площадей, занятых микрофиламентами относительно некротических клеток, составляющих их цитоскелет и являющихся ультраструктурным проявлением морфологической дифференцировки [379]. Наблюдали увеличение площадей,

занятых цистернами ЭПР, которые сочетались с уменьшением ($p < 0,05$) участков полирибосом по сравнению с апоптотическими клетками, что указывает на агранулярный тип ЭПР. Была выявлена деградация ядрышек, конденсированного гетерохроматина ядра, вторичных лизосом и пиносом. В результате проведения электронно-микроскопического исследования подобные везикулы обнаружены в эндимоме [375], астробластоме [380] и злокачественной меланоме [381].

Отличительным признаком ультраструктуры погибших по смешанному типу клеток МБ при действии NGF служило наличие ядрышек (рисунок 3.35).

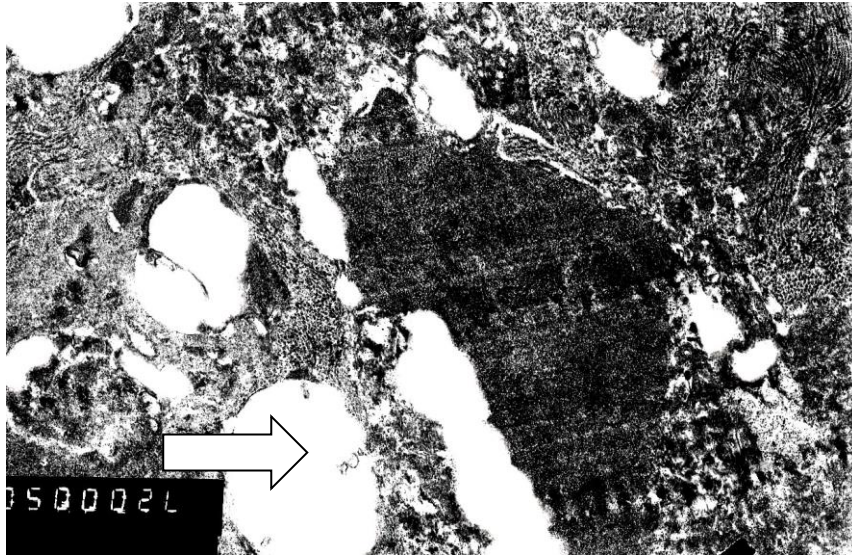


Рисунок 3.35. Микрофотография клетки МБ, погибшей по смешанному типу при действии NGF ($8,8 \times 10^{-9} \text{M}$) *in vitro*, ув. 7200. Стрелкой обозначены вакуоли

Наблюдали снижение размеров вакуолей и областей, занятых микрофиламентами по сравнению с клетками, погибшими по смешанному типу в контроле и по типу некроза при использовании NGF.

В результате применения CSP на клетки МБ отмечали их гибель по типам апоптоза – в 95,2% электроннограмм и некроза – в 4,8%. Характер гибели опухолевых клеток при действии CSP отличался от клеток ПА, где апоптоз наблюдался в 32% электроннограмм, некроз – в 60% и смешанный тип – в 8% электроннограмм. Характерной чертой клеток МБ, погибших по типу апоптоза (рисунок 3.36), служило уменьшение площадей ядер и цитолизиса, сочетавшееся с повышением степени конденсации гетерохроматина ядра и деградацией ядрышек по сравнению с клетками, погибшими по типу апоптоза в контрольной серии.

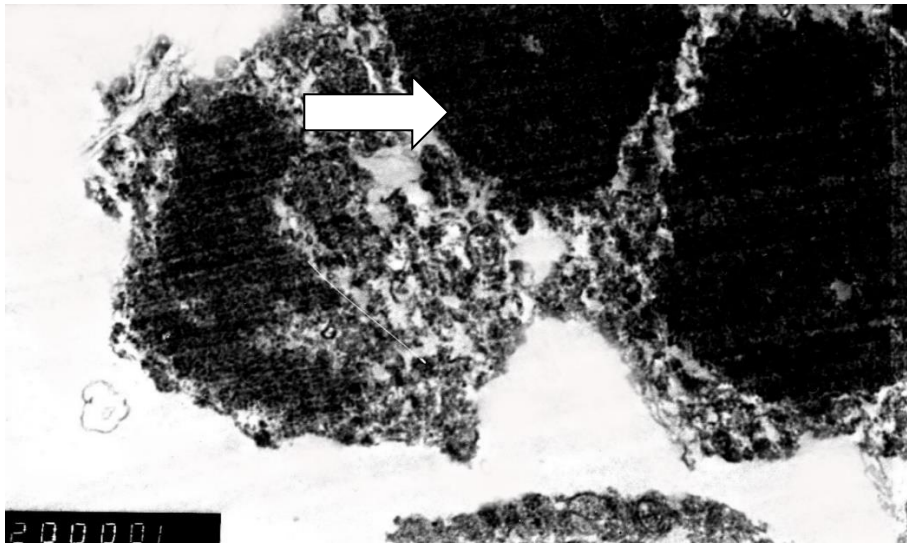


Рисунок 3.36. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу апоптоза при действии CSP ($3,33 \times 10^{-6} \text{M}$) *in vitro*, ув. 10000. Стрелка указывает на гиперконденсированное ядро

В данных клетках не наблюдали липидных капель. Выявляли возрастание площадей митохондрий и первичных лизосом относительно интактных, погибших по типам апоптоза и некроза клеток контроля. Отмечали появление вторичных лизосом, что свидетельствует об интенсивности и глубине протекания лизосомального «переваривания» органелл и цитоплазмы.

Среди особенностей некротических клеток МБ, наблюдавшихся в результате использования CSP, отмечали снижение размеров липидных капель и уплотнение матрикса округленных митохондрий, что подтверждает отсутствие действия химиопрепарата на окислительное фосфорилирование и синтез АТФ [357]. В некротических клетках наблюдали деградацию плазмалеммы, нуклеоплазмы, ядрышек и конденсированного хроматина ядра, повышение областей первичных лизосом. В результате действия CSP нарушается репликация и синтез митохондриальной ДНК, на что указывает увеличение размеров органелл по сравнению с жизнеспособными клетками в контроле [357].

При применении комбинации NGF + CSP ($3,33 \times 10^{-7} \text{M}$) отмечали гибель клеток МБ по типам апоптоза – в 37,5% электроннограмм, некроза – в 50% и смешанному типу – в 12%. Отличительными ультраструктурными особенностями некротических клеток МБ, погибших в результате использования NGF с CSP, явилось наличие ядрышек (рисунок 3.37). Наблюдали возрастание численности полирибосом по сравнению с клетками, погибшими по типу апоптоза при действии комбинации. Отмечали уменьшение количества микрофилламентов относительно некротических клеток МБ при NGF.

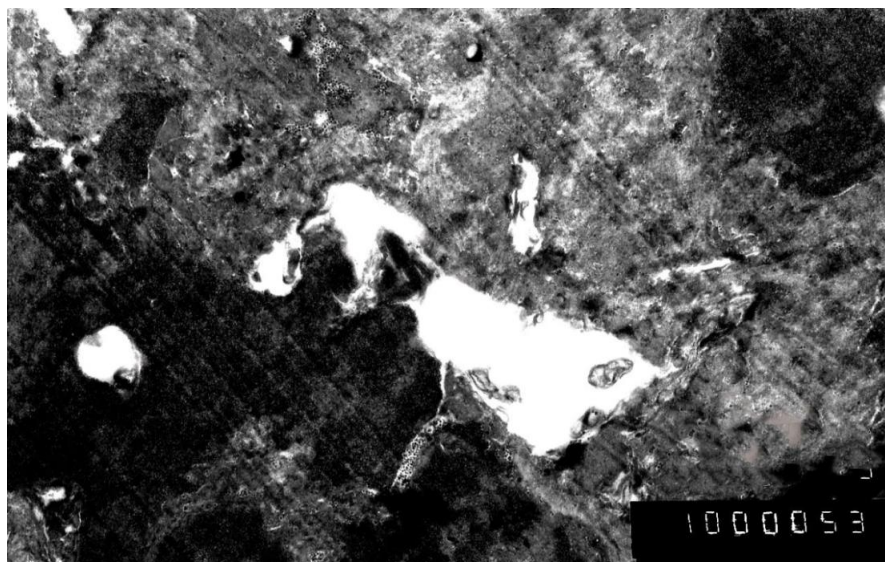


Рисунок 3.37. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу апоптоза при действии комбинации NGF ($8,8 \times 10^{-9}M$) с CSP ($3,33 \times 10^{-7}M$) *in vitro*, ув. 10000

Отсутствовали митохондрии, липидные капли, цистерны ЭПР, первичные, вторичные пиносомы, крупные лизосомы и конденсированный гетерохроматин ядра.

К особенностям клеток МБ, погибшим по смешанному типу при комбинированном действии NGF с CSP (рисунок 3.38) относилось увеличение площадей ядер по сравнению с клетками, погибшими по типам апоптоза и некроза в результате применения данной комбинации.

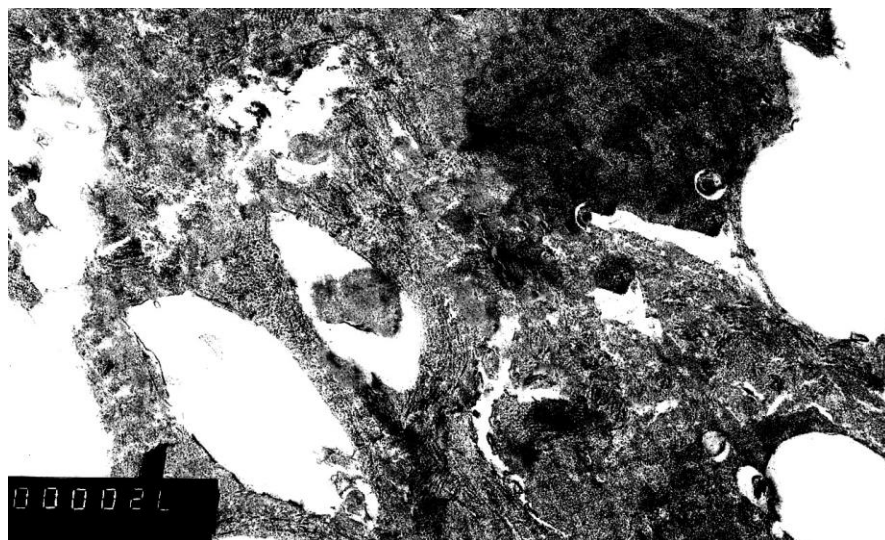


Рисунок 3.38. Микрофотография клетки МБ, погибшей по смешанному типу при действии NGF ($8,8 \times 10^{-9}M$) с CSP ($3,33 \times 10^{-7}M$) *in vitro*, ув. 7200

Отмечали исчезновение полирибосом и возрастание численности везикул по сравнению с клетками, погибшими по типу некроза. Также констатировали наличие первичных пиносом, отсутствующих в клетках, погибших при апоптозе и некрозе при применении NGF с CSP. Наблюдали неправильной формы, лишенные кариолеммы ядра с кариорексисом, деградацию ядрышек, митохондрий и липидных капель как в клетках, погибших по типу апоптоза при

использовании данной комбинации. Таким образом, добавление CSP в комбинацию приводит к стимулированию активности лизосомального аппарата.

В результате действия TMZ на клетки МБ отмечается в 93,7% гибель по типу некроза, а в 6,3% – гибель по смешанному типу (рисунок 3.39).

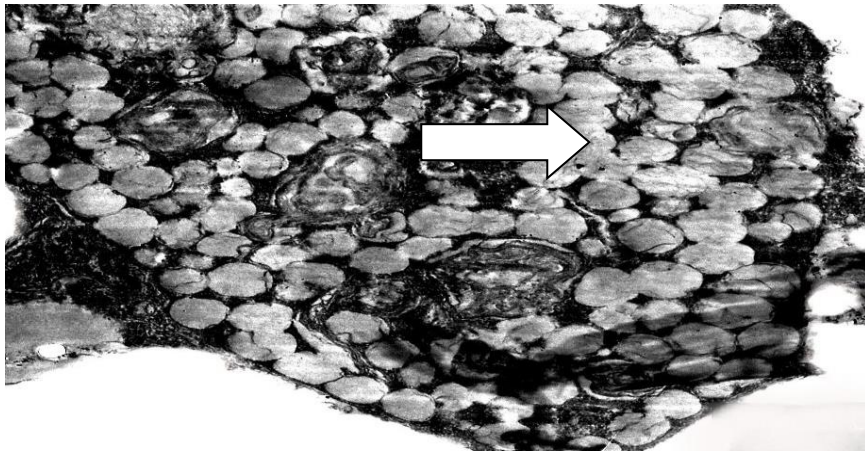


Рисунок 3.39. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу некроза при действии TMZ ($10,3 \times 10^{-6} \text{M}$) *in vitro*, ув. 4800. Стрелкой показаны многочисленные липидные капли

Особенности клеток МБ, погибших по типу некроза, включали такие как: присутствие плазмалеммы, увеличение площадей округленных, электронно-плотных митохондрий, вакуолей, вторичных пиносом и липидных капель по сравнению с неповрежденными клетками контроля.

К ультраструктурным признакам клеток МБ, погибших по смешанному типу в результате применения TMZ, относили: уменьшение размеров ядер по сравнению с некротическими клетками и отсутствие липидных капель (рисунок 3.40).

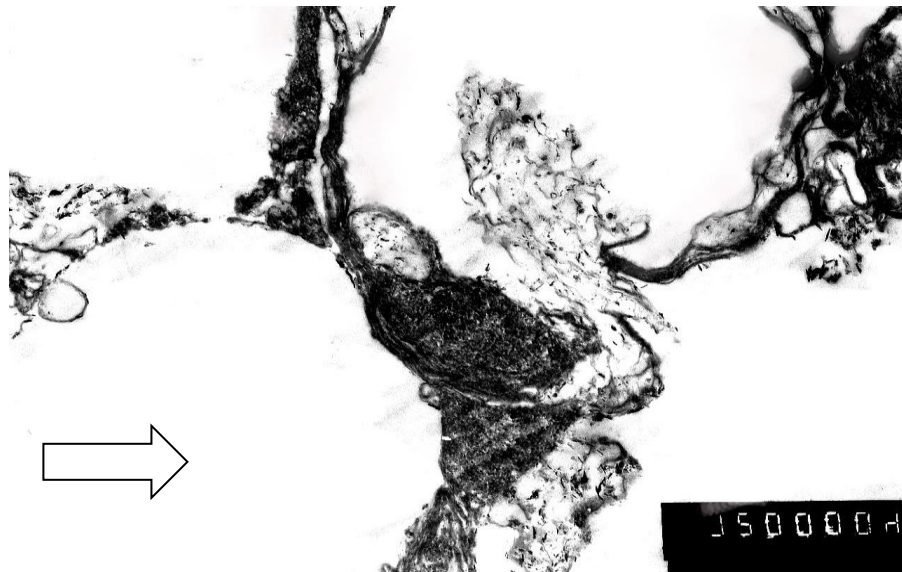


Рисунок 3.40. Микрофотография клетки МБ, погибшей по смешанному типу при действии TMZ ($10,3 \times 10^{-6} \text{M}$) *in vitro*, ув. 7200. Стрелкой показаны огромные вакуоли

Наблюдали увеличение вакуолей и первичных лизосом Аналогично клеткам в контроле, погибших по смешанному типу, отмечали деградацию ядрышек, степень конденсации хроматина составляла 100%.

При применении комбинации NGF + TMZ ($1,03 \times 10^{-7} \text{M}$) наблюдается гибель 53,4% клеток МБ по типу некроза и 46,6% – по смешанному типу. Отличительными признаками ультраструктуры некротических клеток МБ, погибших при использовании данной комбинации, являлись промежуточные размеры вакуолей по сравнению с клетками, погибшими по типу некроза при действии химиопрепарата и NGF. Отсутствовали первичные, вторичные пиносомы и крупные лизосомы, что указывает на подавление пиноцитоза в МБ. Наблюдалось уменьшение областей микрофиламентов в отношении некротических клеток в результате применения NGF.

К особенностям клеток МБ, погибших по смешанному типу при действии комбинации NGF + TMZ, отмечали снижение численности липидных капель и участков цитолиза по сравнению с клетками, погибшими по типу некроза при применении TMZ. Наблюдалось возрастание количества микрофиламентов по сравнению с некротическими клетками под действием данной комбинации реагентов. Отсутствовали митохондрии, которые присутствовали в клетках, погибших по смешанному типу при обособленном действии NGF и TMZ. Численность клеток МБ, погибших по разным типам, при использовании CSP, TMZ, NGF и его комбинаций с CSP или TMZ представлена в таблице 3.13.

Таблица 3.13

Интенсивность спонтанных и индуцированных типов гибели клеток МБ при действии CSP, TMZ, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами *in vitro*

Тип гибели	Процент погибших клеток (абсолютный апоптотический, некротический, смешанного типа индексы), %					
	серия эксперимента					
	контроль	CSP	NGF + CSP	TMZ	NGF + TMZ	NGF
Апоптоз	9,9 ± 1,9	95,2 ± 1,5 (#√)	37,5 ± 6,3 (†°√)	–	–	9,2 ± 1,4 (#^)
Некроз	7,6 ± 1,3	4,8 ± 0,9 (*)	50,0 ± 8,0 (*†^√)	93,7 ± 2,0 (*^√)	53,4 ± 3,8 (*†°√)	69,3 ± 2,8 (*^√)
Смешанный тип	7,6 ± 1,2	–	12,5 ± 3,5 (*#)	6,3 ± 0,8 (*#)	46,6 ± 4,5 (*†°√)	21,5 ± 2,2 (*#√)

Примечание: знаками † и ° обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия комбинированного от обособленного действия химиопрепарата и NGF соответственно. Символы *, # и ^ указывают на статистически значимые ($p < 0,05$) отличия численности клеток от погибших по типам апоптоза, некроза или смешанного соответственно при обособленном или комбинированном действии каждого реагента. Символом √ обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия в численности клеток, погибших по определенному типу гибели в

результате применения химиопрепаратов, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами от гибели клеток по данному типу в контроле

Данные таблицы 3.13 констатируют, что при действии CSP усиливается ($p < 0,05$) гибель клеток МБ (до 95,2%) по типу апоптоза по сравнению с контролем и статистически значимо не изменяется численность клеток, погибших по типу некроза. В результате действия NGF статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивается (до 69,3% и 21,5%) количество опухолевых клеток, погибших по типам некроза и смешанного соответственно по отношению к контролю, тогда как не изменяется численность клеток, погибших по типу апоптоза. В результате нанесения комбинации NGF + CSP на клетки МБ отмечается снижение ($p < 0,05$) количества клеток, погибших по типу апоптоза (до 37,5%) по сравнению с обособленным действием CSP, но увеличивается ($p < 0,05$) численность клеток, погибших по данному типу по сравнению с обособленным действием NGF. В результате действия TMZ на клетки МБ увеличивается ($p < 0,05$) численность клеток, погибших по типу некроза (до 93,7%) по отношению к контролю. При применении комбинации NGF + TMZ снижается ($p < 0,05$) численность клеток, погибших по типу некроза относительно клеток МБ, обработанных NGF и TMZ.

3.5. Потенциальные маркеры чувствительности клеток пилоцитарной астроцитомы, эпендимомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека к фактору роста нервов и химиопрепаратам

3.5.1. Корреляционные зависимости между химиочувствительностью, степенью злокачественности клеток пилоцитарной астроцитомы, эпендимомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы и уровнем интерлейкина-6

В культуральной среде оценивали уровень секреции IL-6 клетками пациентов с ПА (рисунок 3.41), АА (рисунок 3.42), ГБ (рисунок 3.43) и МБ (рисунок 3.44) при односуточном действии химиопрепаратов и NGF. При односуточном действии химиопрепаратов и NGF наблюдали следующие изменения уровня секреции IL-6 клетками ПА, АА, ГБ и МБ по сравнению с контролем: 1) снижение ($p < 0,05$) IL-6 отмечали при действии четырех из семи (57%) химиопрепаратов: карбоплатина, метотрексата, циклофосфамида и винкристина на клетки ПА; шести из восьми (75%) химиопрепаратов: карбоплатина, метотрексата, циклофосфамида, винкристина, CSP и цитарабина на клетки АА; пяти из восьми (63%) химиопрепаратов: циклофосфамида, винкристина, TMZ, цитарабина и этопозиды на клетки ГБ; шести из восьми (75%) химиопрепаратов: карбоплатина, метотрексата, циклофосфамида, TMZ, цитарабина и этопозиды на клетки МБ; 2) отсутствие статистически значимых изменений уровня секреции IL-6 наблюдали в результате действия: трех из семи (43%) химиопрепаратов: CSP, цитарабина и этопозиды на клетки ПА; двух из восьми (25%) химиопрепаратов: TMZ и этопозиды на клетки АА; трех из восьми (38%) химиопрепаратов: CSP, метотрексата и

карбоплатина на клетки ГБ; двух из восьми (25%) химиопрепаратов: винкристина и CSP на клетки МБ

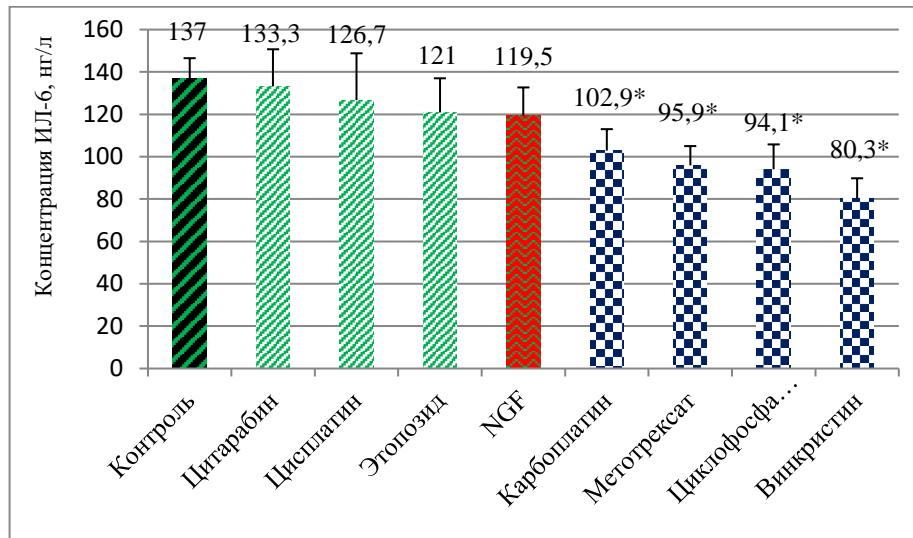


Рисунок 3.41. Уровень секреции ИЛ-6 клетками ПА при действии *in vitro* химиопрепаратов и NGF. Здесь и на рисунках 3.42–3.44 символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия уровня ИЛ-6 в результате действия химиопрепаратов и NGF от контроля

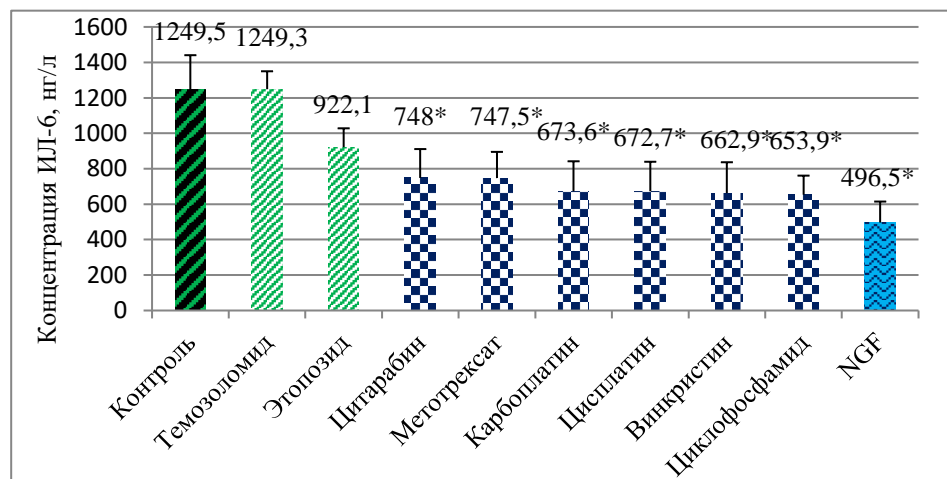


Рисунок 3.43. Уровень секреции ИЛ-6 клетками АА при действии *in vitro* химиопрепаратов и NGF

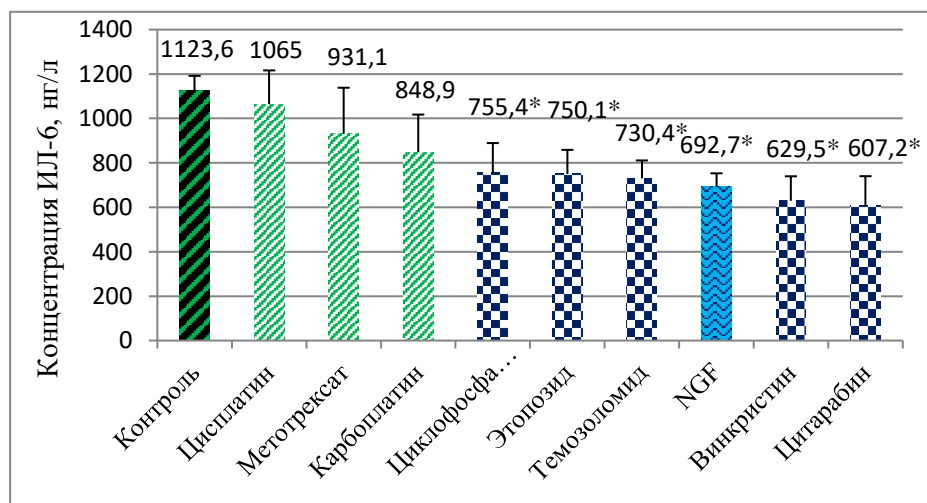


Рисунок 3.43. Уровень секреции ИЛ-6 клетками ГБ при действии *in vitro* химиопрепаратов и NGF

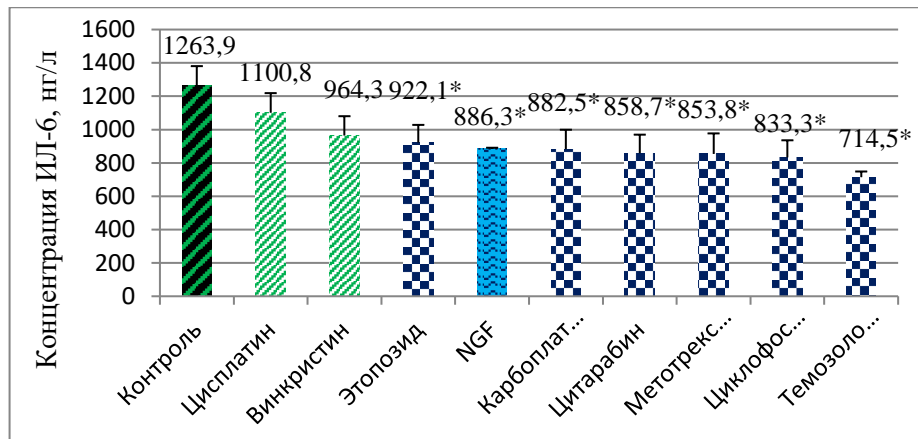


Рисунок 3.44. Уровень секреции ИЛ-6 клетками МБ при действии *in vitro* химиопрепаратов и NGF

В результате применения *in vitro* NGF наблюдали статистически значимое ($p < 0,05$) снижение секреции ИЛ-6 клетками АА, ГБ и МБ. В результате действия NGF статистически значимо не изменяется уровень секреции ИЛ-6 клетками ПА. Кроме того, уровень ИЛ-6 статистически значимо ($p < 0,0001$) отличался в контрольных посевах высокозлокачественных АА, ГБ, МБ (более 400–500 пг/мл) и низкозлокачественных ПА (от 0–200 пг/мл) опухолей. Для того, чтобы изучить корреляцию между степенью злокачественности опухолей и уровнем секреции ими ИЛ-6, на данном этапе в исследование были включены пациенты с эпендимомой (GrII, $n=5$, $n=135$ алиquot, приложение 1, таблица 1.5). Установлено, что уровень секреции ИЛ-6 клетками ПА, эпендимомы, АА, ГБ и МБ под действием химиопрепаратов и NGF изменяется в зависимости от степени злокачественности опухолей (таблица 3.14).

Таблица 3.14

Коэффициенты корреляций между степенью злокачественности клеток ПА, эпендимомы, АА, ГБ и МБ и уровнем секреции ИЛ-6 при действии *in vitro* химиопрепаратов и NGF

Тип опухоли, степень злокачественности, Gr	Химиопрепарат, NGF	Уровень секреции ИЛ-6 (нг/л)		Коэффициент корреляции, r	Уровень значимости r, p
		низкозлокачественны I–II, n=16	высокозлокачественны III–IV, n=21		
Пилоцитарная астроцитома, I Эпендимома, II Анапластическая астроцитома, III Глиобластома, IV Медуллобластома IV	Контроль	115,3±8,7	1212,3±44,6 (*)	0,70	$p < 0,001$
	Винкристин	66,9±13,5	805,1±84,6 (*)	0,61	$p < 0,001$
	Карбоплатин	84,6±8,1	801,7±64,7 (*)	0,58	$p < 0,001$
	Метотрексат	81,5±7,3	844,1±53,2 (*)	0,57	$p < 0,001$
	Темозоломид	–	784,2±78,2	–	–
	Циклофосфамид	81,5±12,6	747,5±51,9 (*)	0,64	$p < 0,001$
	Цисплатин	111,1±16,0	997,4±90,3 (*)	0,65	$p < 0,001$
	Цитарабин	120,7±13,6	737,9±72,8 (*)	0,53	$p < 0,001$
	Этопозид	103,2±12,0	864,7±57,3 (*)	0,61	$p < 0,001$
	NGF	99,6±10,4	728,8±64,6 (*)	0,64	$p < 0,001$

Примечание: жирным шрифтом обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) значения корреляционной зависимости, при степенях свободы $df=109$, n – количество пациентов, символ * обозначает статистически значимые ($p < 0,05$) отличия между уровнем секреции ИЛ-6 при применении химиопрепаратов, NGF в группах низко- и высокозлокачественных опухолей.

Данные таблицы 3.14 показывают наличие статистически значимых ($p < 0,001$) положительных корреляций между степенью злокачественности опухолей (ПА, АА, ГБ, МБ и эпендимома, GrI–IV) и уровнем секреции IL-6 в результате действия химиопрепаратов ($r=0,53-0,65$, $df=109$) и NGF ($r=0,64$, $df=109$). Установлено, что по мере увеличения степени злокачественности опухоли наблюдается снижение уровня IL-6 при применении химиопрепаратов и NGF (таблица 3.15).

Таблица 3.15

Зависимость уровня снижения IL-6 от степени злокачественности клеток интракраниальных опухолей под действием химиопрепаратов и NGF

Степень злокачественности опухоли	Средний уровень секреции интерлейкина-6, нг/л		
	в контроле	при действии химиопрепаратов и NGF	уровень снижения секреции по отношению к контролю, %
Низкозлокачественные (ПА, эпендимома)	115,3 ± 8,7	93,6 ± 5,5	18,8±4,7
Высокозлокачественные (АА, ГБ и МБ)	1212,3 ± 44,6	812,4 ± 27,8*	33,0±2,0*, $p < 0,001$

Примечание: знаком * обозначены статистически значимые отличия уровня снижения секреции IL-6 при применении химиопрепаратов и NGF от уровня IL-6 в аликвотах контроля. Уровень снижения секреции IL-6 по отношению к контролю, в % показывает разницу между секрецией IL-6 в контроле и в результате действия химиопрепаратов и NGF, которую рассчитывали по формуле: $100 - ((\text{секреция IL-6 при действии реагентов} / \text{секреция IL-6 в контроле}) \times 100)$

Таким образом, обнаружено, что в результате действия *in vitro* химиопрепаратов и NGF наблюдается статистически значимое ($p < 0,001$) снижение уровня снижения секреции IL-6 по сравнению с необработанными клетками высокозлокачественных опухолей (АА, ГБ и МБ).

Установлены корреляции между секрецией IL-6 и ответом клеток ПА, эпендимомы, АА, ГБ и МБ на химиопрепараты и NGF (таблица 3.16).

Таблица 3.16

Коэффициенты корреляций между уровнем секреции IL-6 и ИЦ химиопрепаратов, NGF при нанесении *in vitro* на клетки ПА, эпендимомы, АА, ГБ и МБ

Гистологический тип опухоли	Химиопрепараты, коэффициент корреляции r , уровень значимости, p	NGF, коэффициент корреляции r , уровень значимости, p
Пилоцитарная астроцитома	0,09 ($df=229$), не достоверно	0,45 ($df=31$), $p < 0,02$
Эпендимома	-0,60 ($df=103$), $p < 0,001$	-0,95 ($df=13$), $p < 0,0001$
Анапластическая астроцитома	-0,33 ($df=82$), $p < 0,01$	-0,39 ($df=13$), не достоверно
Глиобластома	-0,22 ($df=130$), $p < 0,02$	-0,49 ($df=19$), $p < 0,05$
Медуллобластома	-0,21 ($df=208$), $p < 0,01$	-0,31 ($df=28$), не достоверно

Примечание: df - число степеней свободы, жирным шрифтом обозначены достоверные корреляции

Данные таблицы 3.16 показывают наличие: 1) статистически значимой ($r=0,45$, $p<0,02$) положительной корреляции между ИЦ NGF и уровнем секреции IL-6 клетками ПА. 2) статистически значимых отрицательных корреляций ($r=-0,60$, $-0,33$, $-0,22$ и $-0,21$) между ИЦ химиопрепаратов и уровнем секреции IL-6 клетками эпендимомы, АА, ГБ и МБ, соответственно. Такого же знака корреляции обнаружены между ИЦ NGF и уровнем секреции IL-6 клетками эпендимомы ($r=-0,95$, $p<0,0001$, $df=13$) и ГБ ($-0,49$, $p<0,05$, $df=19$). 3) отсутствие статистически значимых корреляций между ИЦ химиопрепаратов и уровнем секреции IL-6 клетками ПА, а также между ИЦ NGF и IL-6, секретлируемого клетками АА и МБ (таблица 3.16).

Таким образом, целесообразным представляется определение секреции IL-6 клетками высокозлокачественных интракраниальных опухолей (АА, ГБ и МБ) в результате действия химиопрепаратов, что в перспективе открывает возможности использования IL-6 в качестве маркера злокачественности и химиорезистентности интракраниальных опухолей. Результаты автора дополняют фактический материал относительно иных типов рака [41, 261], показывая, что уровень секреции IL-6 изменяется в зависимости от гистологического типа и степени злокачественности опухолей мозга.

3.5.2. Изменение экспрессии TrkA, p75 рецепторов, их соотношения на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы при действии фактора роста нервов и его комбинаций с цисплатином и темозоломидом

Химиотерапия АА, ГБ и МБ проводится с применением протоколов НИТ-GBM-D [8], RNO-05 [382], НИТ-2000 [344], в состав которых входят CSP и TMZ [113]. Эти химиопрепараты выбраны для изучения изменения экспрессии рецепторов TrkA, p75, их соотношения (TrkA/p75) на опухолевых клетках в комбинации с NGF. Определяли количество опухолевых клеток, экспрессирующих TrkA и p75 рецепторы по анализу интенсивности FITC-флуоресценции моноклональных антител в пересчете на одну клетку. Анализ результатов позволил выделить две группы в каждой из которых статистически значимо ($p<0,05$) преобладала экспрессия TrkA или p75 рецепторов на клетках опухолей при использовании NGF и его комбинаций с CSP или TMZ (рисунки 3.45, 3.46).

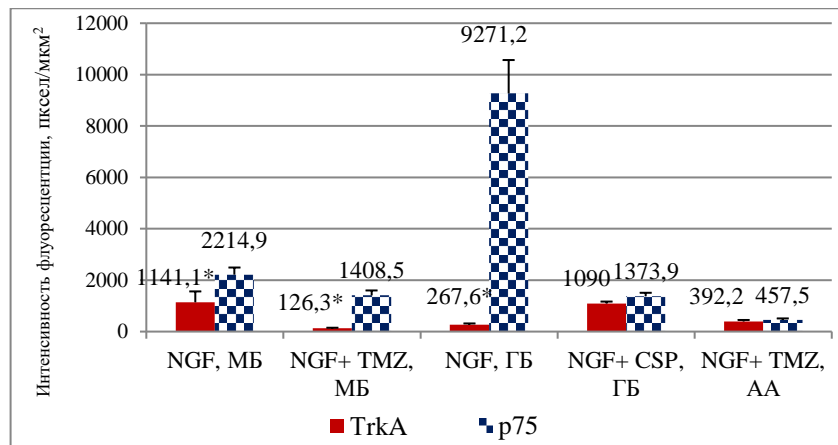


Рисунок 3.45. Серии экспериментов, где на опухолевых клетках преобладала экспрессия p75 рецептора (группа «p75»). Здесь и на рисунке 3.46 символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия экспрессии TrkA рецептора от p75 в пределах одной серии

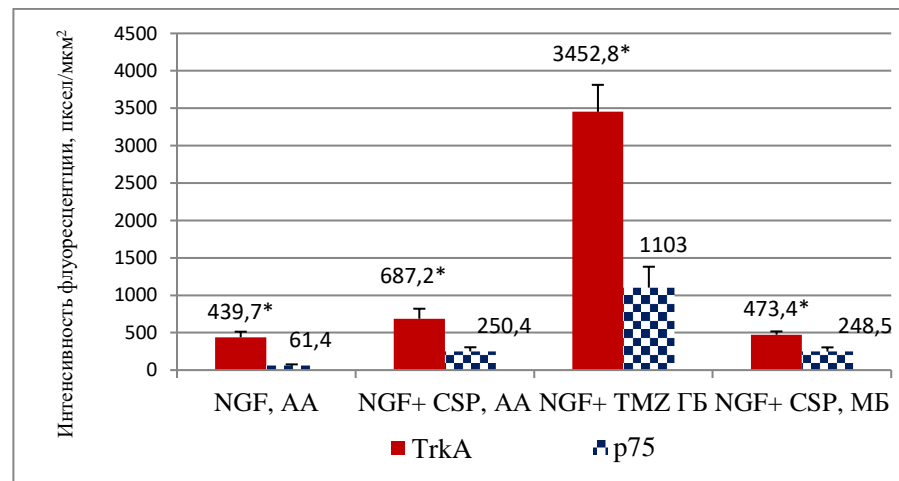


Рисунок 3.46. Серии экспериментов, где на опухолевых клетках преобладала экспрессия TrkA рецептора (группа «TrkA»)

К группе «p75» (рисунок 3.45) были отнесены 5 серий опытов, в каждой из которых на клетки одного типа опухоли действовали одним из реагентов: NGF и комбинацией NGF + TMZ на МБ; NGF, комбинацией NGF с CSP на ГБ; NGF с TMZ на АА.

К группе «TrkA» (рисунок 3.46) были отнесены четыре серии: при действии комбинации NGF с CSP на клетки МБ, комбинации NGF с TMZ на ГБ; NGF, комбинации NGF с CSP на клетки АА.

Из данных, представленных на рисунках 3.45 и 3.46, видно, что экспрессия TrkA рецептора в пределах каждой серии статистически значимо ($p < 0,05$) отличается от экспрессии p75 рецептора. Исключение составили клетки ГБ при применении комбинации NGF с CSP и клетки АА под действием NGF с TMZ.

Следует обратить внимание, что в пределах одной серии все пациенты с одним типом опухоли были отнесены к одной группе («TrkA» или «p75»), то есть на опухолях всех

пациентов наблюдалось доминирование экспрессии одного типа рецепторов. Тогда как на опухолях тех же пациентов под действием другого реагента (в другой серии) наблюдалось доминирование экспрессии другого типа рецепторов для всех лиц. Например, все пациенты ($n=7$) с МБ при действии NGF и комбинации NGF с TMZ были отнесены к группе «p75», а при использовании NGF с CSP эти же пациенты были отнесены к группе «TrkA». Необходимо отметить, что экспрессия p75 рецепторов статистически значимо ($p<0,05$) отличается от TrkA рецепторов как внутри каждой из указанных групп («TrkA», «p75»), так и между ними (таблица 3.22). В группе «p75» преобладала экспрессия p75 рецептора, которая была статистически значимо ($p=0,001$) выше экспрессии в группе «TrkA», и, наоборот. Автор определил соотношение рецепторов TrkA/p75 на клетках опухолей (таблица 3.17).

Таблица 3.17

Экспрессия TrkA и p75 рецепторов, TrkA/p75 и индекс цитотоксичности в группах пациентов с доминированием TrkA и p75 рецепторов

Показатель	Группа «TrkA»		Группа «p75»		Уровень значимости между группами, p
	уровень значимости и внутри группы, p	уровень значимости и внутри группы, p			
Интенсивность флуоресценции к TrkA, пиксел/мкм ²	1379,9±316,7	$p=0,01$	616,2±137,1	$p=0,0005$	$p=0,04$
Интенсивность флуоресценции к p75, пиксел/мкм ²	459,2±153,4		3095,9±652,7		$p=0,0002$
Разница, %	842,4±455,3		1587,9±206,5		$p=0,03$
Соотношение TrkA / p75	7,7±0,2		0,6±0,2		$p=0,0004$
Индекс цитотоксичности, %	48,8±3,5		45,4±4,8		$p=0,39$

Примечание: жирным шрифтом обозначены статистически значимые показатели уровня значимости $p<0,05$. Разница % – это различие между экспрессией доминирующего и субдоминирующего рецепторов в % в серии эксперимента, рассчитанная по формуле: $((\text{экспрессия TrkA} / \text{экспрессия p75}) \times 100) - ((\text{экспрессия p75} / \text{экспрессия TrkA}) \times 100)$ в серии, где преобладала экспрессия TrkA рецептора и $((\text{экспрессия p75} / \text{экспрессия TrkA}) \times 100) - ((\text{экспрессия TrkA} / \text{экспрессия p75}) \times 100)$ в серии, где преобладала экспрессия p75 рецептора. В таблице приведены средние значения \pm среднее отклонение, вычисляемые по данным всех пациентов (во всех сериях) в пределах одной группы

Данные таблицы 3.17 показывают, что уровень экспрессии TrkA и p75 рецепторов и TrkA/p75 в группах «TrkA» и «p75» статистически значимо отличаются как в пределах данной группы, так и между ними ($p=0,04$, $p=0,0002$ и $p=0,0004$ соответственно). Между группами были выявлены статистически значимые ($p=0,03$) отличия для величин, выражающих в процентном отношении разницу экспрессии доминирующего над субдоминирующим типами

рецепторов («разница %»), данный показатель был выше в группе «p75». При одинаковом уровне ИЦ в группах «TrkA» и «p75» этот факт свидетельствует о большей аффинности TrkA рецептора и различиях в механизмах функционирования рецепторов. Он подтверждается цифрами соотношения TrkA/p75 рецепторов, отличающимися между группами в 12,8 раз ($p=0,0004$).

Методом двухфакторного дисперсионного анализа установлена зависимость экспрессии TrkA, p75 рецепторов и их соотношения от типа опухоли и механизма действия NGF и его комбинаций с CSP и TMZ (таблица 3.18).

Таблица 3.18

Зависимость экспрессии TrkA, p75 рецепторов и их соотношения от типа опухоли и механизма действия NGF и его комбинаций с CSP или TMZ

Зависимость экспрессии TrkA, p75 рецепторов и их соотношения	Реагент, уровень значимости, p			
	все реагенты	NGF	NGF + CSP	NGF + TMZ
От типа опухоли, уровень значимости p	$2,0 \times 10^{-11}$ (90)	$0,0028$ (18)	$0,011$ (18)	0,52 (18)
	тип опухоли, уровень значимости, p			
От механизма действия реагента, уровень значимости p	все типы	анапластическая астроцитома	глиобластома	медуллобластома
	$1,1 \times 10^{-23}$ (90)	$0,00074$ (25)	$1,0 \times 10^{-18}$ (30)	$5,8 \times 10^{-9}$ (30)

Примечание: жирным шрифтом обозначены статистически значимые значения уровня значимости $p < 0,05$. В скобках – число степеней свободы (df) для образцов опухолей пациентов под действием NGF и его комбинаций с CSP или TMZ. Цифры в столбцах отражают уровень значимости p

Данные таблицы 3.18 показывают, что экспрессия TrkA, p75 рецепторов и TrkA/p75 статистически значимо зависят от типа опухоли ($p=2,0 \times 10^{-11}$) и механизма действия реагентов ($p=1,1 \times 10^{-23}$). Зависимость от типа опухоли была установлена при действии NGF и комбинации NGF + CSP. Зависимость от механизма действия NGF или его комбинаций установлена для АА, ГБ и МБ. Таким образом, подтверждена более сильная зависимость экспрессии TrkA, p75 рецепторов от механизма действия реагента, чем от типа опухоли.

Анализ полученных результатов позволил поставить вопрос: существует ли взаимосвязь экспрессии TrkA, p75 рецепторов и TrkA/p75 с чувствительностью клеток АА, ГБ и МБ к NGF и его комбинациям с CSP или TMZ? С этой целью автор рассчитывал коэффициент корреляции между ИЦ NGF, комбинаций NGF с CSP, NGF с TMZ и экспрессией TrkA, p75 рецепторов, их

соотношением. С целью выявления механизмов действия NGF и его комбинаций с химиопрепаратами в клетках АА, ГБ и МБ определяли изменение экспрессии TrkA, p75 рецепторов относительно их экспрессии на клетках контрольных серий.

Статистически значимые корреляции между экспрессией TrkA и p75 рецепторов и ИЦ реагентов установлены для клеток АА и ГБ (таблица 3.19).

Таблица 3.19

Коэффициенты корреляций между экспрессией TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75 и индексом цитотоксичности NGF и его комбинаций с CSP или TMZ при действии на клетки АА, ГБ и МБ

in vitro

Тип опухоли, реагент	df	Доминантный тип рецептора в серии	Экспрессия рецепторов по отношению к контрольной серии, %		Коэффициент корреляции с индексом цитотоксичности, r, уровень значимости, p		
			TrkA	p75	TrkA	p75	TrkA/p75
АА-контроль	54	TrkA (6,7)	100,0	100,0	-	-	-
АА-NGF	54	TrkA (7,2)	112,9	106,4	0,13	-0,32	0,43 <i>p</i> <0,05
АА-NGF + CSP	54	TrkA (2,7)*	176,4 #	434 #	-0,19	0,68 <i>p</i> <0,0001	-0,20
АА-NGF+ TMZ	54	нет доминирования	100,7	792,9 #	0,42 <i>p</i> <0,05	-0,51 <i>p</i> <0,01	0,46 <i>p</i> <0,05
ГБ-контроль	68	p75 (20,8)	100,0	100,0	-	-	-
ГБ-NGF	68	p75 (34,6)*	94,6	157,9 #	0,27	-0,71 <i>p</i> <0,0001	0,44 <i>p</i> <0,02
ГБ-NGF+CSP	68	нет доминирования	385,4 #	23,4 #	-0,65 <i>p</i> <0,0001	-0,06	-0,47 <i>p</i> <0,02
ГБ-NGF + TMZ	68	TrkA (3,1)	1221 #	18,8 #	0,50 <i>p</i> <0,001	-0,53 <i>p</i> <0,001	0,63 <i>p</i> <0,0001
МБ-контроль	66	p75 (2,1)	100,0	100,0	-	-	-
МБ-NGF	66	p75 (1,9)	117,4	110,3	0,12	-0,28	0,26
МБ-NGF+ CSP	66	TrkA (1,9)	48,7 #	12,4 #	-0,04	-0,3	0,25
МБ-NGF + TMZ	66	p75 (11,2)*	13 #	70,1	0,27	0,34	-0,01

Примечание: в скобках указаны значения экспрессии доминирующего типа рецептора по отношению к субдоминирующему рецептору в каждой серии (количество доминирующего в соотношении типа рецепторов/количество субдоминирующего рецептора). Жирным шрифтом, знаками * и ** обозначены статистически значимые (*p*<0,05, *p*<0,01) отличия уровней экспрессии доминирующего рецептора по отношению к субдоминирующему рецептору в каждой серии по сравнению с контролем. Экспрессию рецепторов по отношению к контрольной серии, % вычисляли по формуле: (экспрессия TrkA (или p75) под действием реагента / экспрессия TrkA (или p75) в контроле) × 100. Условно экспрессия TrkA или p75 рецепторов в контрольных сериях для каждого типа опухоли принята за 100%. Жирным

шрифтом и символом # обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия экспрессии рецепторов в опытных сериях по отношению к контрольной серии. Жирным шрифтом обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) коэффициенты корреляции ИЦ с экспрессией TrkA и p75 рецепторов и TrkA/p75, df – число степеней свободы для каждой серии экспериментов. Знак прочерка в графах для корреляций в контрольных сериях указывает на то, что данные корреляции не рассчитаны, поскольку ИЦ в контрольных посевах равен нулю

В сериях опытов установлены различные варианты корреляций между ИЦ с экспрессией рецепторов и TrkA/p75. Это свидетельствует о наличии различных механизмов действия NGF и его комбинаций с химиопрепаратами, некоторые из которых можно установить путем сопоставления коэффициентов корреляций со значениями, отражающими в процентах экспрессию TrkA и p75 рецепторов по отношению к экспрессии рецепторов в контрольных сериях. Противоположные знаки коэффициентов корреляций TrkA и p75 рецепторов с ИЦ указывают на антагонизм действия рецепторов по отношению к гибели клеток

Например, на клетках АА при действии NGF наблюдается доминирование экспрессия TrkA рецептора, как в контрольной серии, при этом отмечена положительная корреляция ($p < 0,05$) ИЦ NGF с TrkA/p75. Следовательно, цитотоксический эффект NGF реализуется преимущественно через TrkA рецепторы (таблица 3.19). В результате действия комбинации NGF + CSP на клетки АА наблюдается снижение уровня экспрессии доминирующего в серии TrkA рецептора по отношению к экспрессии p75 рецептора в сравнении с контрольной серией. Положительная ($p < 0,0001$) корреляция ИЦ NGF + CSP с экспрессией p75 рецептора свидетельствует об активации сигнального пути, запускаемого через данный рецептор (таблица 3.19). Механизм действия комбинации NGF + CSP, проявляющийся значительным повышением уровня экспрессии p75 рецепторов (при менее интенсивной экспрессии TrkA), совпадает с механизмом гибели клеток опухоли через p75 рецепторы, что свидетельствует о потенциальной цитотоксической активности данной комбинации реагентов.

Для клеток АА установлены положительные ($p < 0,05$) корреляции между ИЦ комбинации NGF + TMZ с экспрессией TrkA рецептора, TrkA/p75 и отрицательная ($p < 0,01$) корреляция с экспрессией p75 рецептора, что свидетельствует о гибели клеток АА через TrkA-рецептор. Тогда как механизм действия комбинации NGF + TMZ выраженный отсутствием доминирующего типа рецептора в соотношении (в отличие от контроля, где доминирует экспрессия TrkA) и значительным повышением уровня экспрессии p75 рецептора, препятствует ее цитотоксическому действию.

Для клеток ГБ установлена положительная корреляция ($p < 0,02$) между ИЦ NGF и TrkA/p75 и отрицательная ($p < 0,0001$) между ИЦ NGF и экспрессией p75 рецептора, что указывает на гибель клеток ГБ через TrkA-рецепторы. Противоположные знаки корреляционных

зависимостей указывают на антагонизм TrkA и p75 рецепторов, участвующих в инициации гибели опухолевых клеток. На клетках ГБ в результате действия NGF наблюдалось доминирование экспрессии p75 рецептора (также как в контроле) и уменьшение TrkA/p75 в сравнении с контролем. Экспрессия TrkA рецептора статистически значимо не изменялась. Такой механизм действия NGF препятствует гибели клеток ГБ через TrkA рецепторы.

На клетках ГБ выявлены положительные корреляции между ИЦ NGF + TMZ и экспрессией TrkA рецептора ($p < 0,001$), TrkA/p75 ($p < 0,001$) и отрицательная ($p < 0,0001$) корреляция между ИЦ комбинации и экспрессией p75 рецептора. Такие корреляции указывают на то, что гибель клеток ГБ инициируется через TrkA рецепторы. При положительной корреляции между ИЦ комбинации и экспрессией TrkA рецептора, TrkA/p75 механизм действия связан с доминированием TrkA рецептора в 12 раз над p75 (в отличие от контроля, где доминирует p75 рецептор). При отрицательной корреляции между ИЦ комбинации и экспрессией p75 рецептора, его экспрессия была статистически значимо ингибирована (в 5 раз по отношению к контролю). Таким образом, комбинация NGF + TMZ обладает потенциальной противоопухолевой активностью в отношении клеток ГБ.

На клетках МБ не было установлено статистически значимых корреляций между ИЦ NGF, комбинаций с CSP или TMZ и экспрессией TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75. В сериях при нанесении NGF и комбинации NGF + TMZ на клетки МБ доминирует p75 рецептор. При применении NGF наблюдается усиление в большей степени экспрессии p75 рецептора, чем TrkA по сравнению с клетками в контроле, при этом количество рецепторов становится примерно одинаковым. В результате действия комбинации NGF + TMZ на клетки МБ наблюдается ($p < 0,001$) ингибирование экспрессии TrkA рецептора (в 7,5 раз) при незначительном снижении экспрессии p75 рецепторов, что является причиной статистически значимого доминирования p75 рецептора на клетках МБ по сравнению с контролем. В результате действия комбинации NGF + CSP на клетки МБ наблюдали доминирование ($p < 0,05$) экспрессии TrkA рецептора, которая является результатом стимулирования ($p < 0,01$) синтеза молекул TrkA рецептора и сильного ингибирования p75 рецептора. Активность NGF и его комбинаций с CSP или TMZ в отношении клеток МБ, отсутствие статистически значимых корреляций с ИЦ, свидетельствуют о том, что гибель клеток осуществляется через альтернативные сигнальные пути.

Таким образом, установлены статистически значимые положительные и отрицательные корреляции между ИЦ реагентов и экспрессией TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75 на клетках АА и ГБ. Различные варианты корреляционных зависимостей указывают на доминирование разных сигнальных каскадов, запускающих гибель опухолевых клеток. TrkA рецепторы активируются при действии NGF, комбинации NGF с TMZ на клетках АА и ГБ соответственно. При

использовании комбинации NGF с CSP установлена гибель клеток АА и ГБ через p75 рецепторы. На клетках МБ статистически значимых корреляций экспрессии указанных рецепторов с ИЦ не обнаружено. На всех типах опухолей установлен функциональный антагонизм экспрессии TrkA, p75 рецепторов по отношению к гибели клеток (только в случае применения NGF с CSP на клетках ГБ он маскируется экспрессией aberrantных TrkAIII рецепторов). Соотношение TrkA/p75 рецепторов и коэффициент его корреляции с ИЦ указывают на механизм (сигнальный каскад), по которому инициируется гибель клеток опухоли в результате действия NGF и его комбинаций с CSP или TMZ. Следовательно, на гибель опухолевых клеток также влияет тип доминирующего рецептора, его статус, описываемый TrkA/p75 (сверхэкспрессия, ингибирование или одинаковое количество) и, возможно, формирование структурных гетерокомплексов TrkA-p75 рецепторов. На наличие последнего факта указывают коэффициенты корреляций между ИЦ реагентов и экспрессией TrkA, p75 рецепторов одного знака и соответствующие им функциональные изменения экспрессии рецепторов [24, 226, 383]. Чувствительность клеток АА и ГБ под действием NGF и его комбинаций с CSP или TMZ зависит от экспрессии TrkA, p75 рецепторов и TrkA/p75, а, следовательно, предопределяется механизмом действия реагентов и типом опухоли.

3.6.3. Влияние фактора роста нервов на количество копий MYCC, MYCN-онкогенов в клетках медуллобластомы

Определение численности копий MYCC, MYCN-онкогенов в клетках МБ проведено для выявления амплификации онкогенов, которая позволила оптимизировать стратификацию пациентов по группам риска, определяющим интенсивность и продолжительность химиотерапии. Амплификация MYCC, MYCN-онкогенов установлена у 4 пациентов (22,2%) (рисунок 3.47Б).

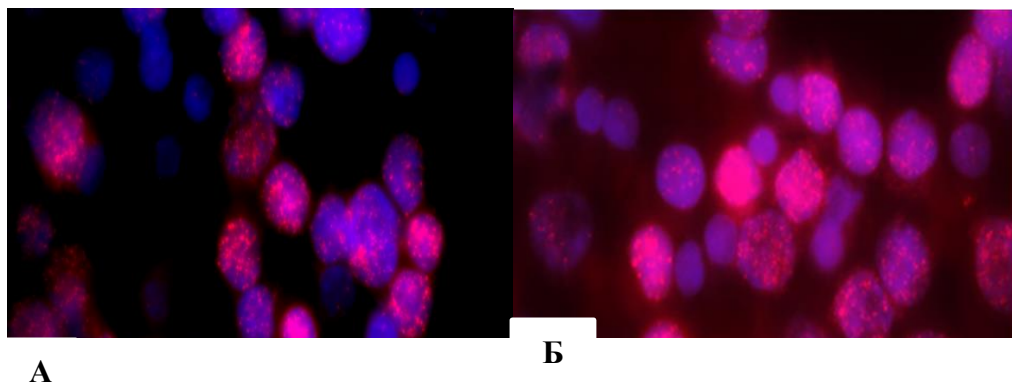


Рисунок 3.47. Амплификация MYCN-онкогена у пациента К. (А) и MYCC-онкогена у пациента Л. (Б) в клетках МБ, визуализируемая при выполнении FISH анализа. Каждая красная точка – копия MYCN, MYCC- онкогенов

Например, у пациента К. 85% клеток опухоли содержали 50–70 копий *MYCN*-онкогена (рисунок 3.48А), а 70% клеток МБ пациента Л. содержали 70–80 копий *MYCC*-онкогена.

Также изучали изменение численности копий *MYCC* и *MYCN*-онкогенов в клетках МБ при применении NGF (рисунки 3.48, 3.49).

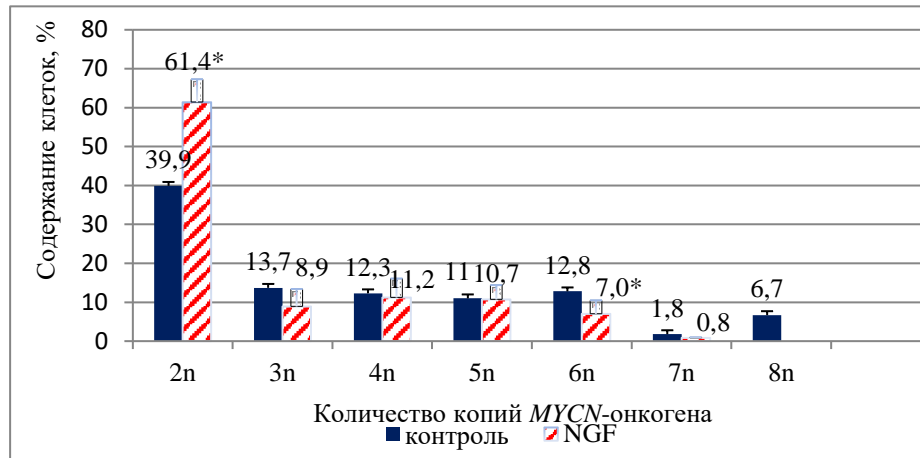


Рисунок 3.48. Содержание клеток МБ, содержащих двух-восьмикратное количество копий *MYCN*-онкогена при односуточном *in vitro* действии NGF

Здесь и на рисунке 3.49 символом *обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия числа копий онкогена в клетках МБ при применении NGF от клеток опухоли в контрольной серии

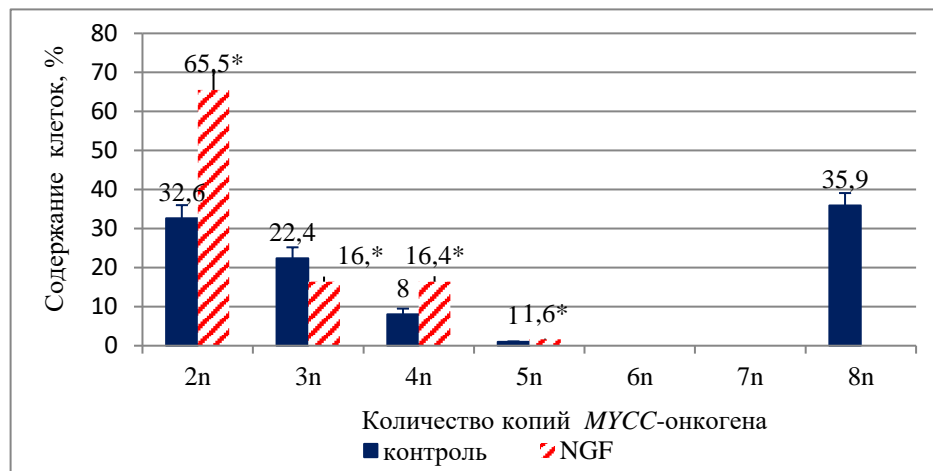


Рисунок 3.49. Содержание клеток МБ, содержащих двух-восьми-кратное количество копий *MYCC*-онкогена при односуточном *in vitro* действии NGF

Изменения числа копий онкогенов в клетках МБ под действием NGF были представлены тремя вариантами:

1) снижение ($p < 0,05$) на $72,7 \pm 17,4\%$ доли клеток МБ содержащих 6n, 8n копий *MYCN*-онкогена и на $63,4 \pm 26,6\%$ численности клеток, содержащих 3n, 8n копий *MYCC*-онкогена, причем действие NGF нивелировало до нуля их количество с восьмью копиями обоих онкогенов; 2) увеличение ($p < 0,05$) на $78,8 \pm 12,7\%$ доли клеток МБ, содержащих 2n набор копий обоих онкогенов; 3) отсутствие статистически значимых изменений доли клеток МБ, содержащих 3-, 4-, 5-, 7n копий *MYCN*-онкогена.

Таким образом, данные, представленные на рисунках 3.48 и 3.49, показывают, что при действии NGF на клетки МБ статистически значимо ($p < 0,05$) наблюдается снижение доли клеток, содержащих 6n, 8n копий *MYCN*-онкогена и 3n, 8n копий *MYCC*-онкогена, и увеличение ($p < 0,05$) доли клеток, содержащих диплоидный набор обоих онкогенов.

Результаты исследования позволили поставить вопрос: как чувствительность клеток МБ зависит от среднего количества копий онкогенов? Для этого рассчитывали среднее количество копий *MYCC*, *MYCN*-онкогенов и коэффициент их корреляции с ИЦ NGF (таблицы 3.20, 3.21).

Таблица 3.20

Средняя численность копий *MYCN*, *MYCC*-онкогенов в клетках МБ при действии NGF

Серия опыта	Количество клеток, содержащих 2–8 копий онкогенов, %							Среднее число копий
	2n	3n	4n	5n	6n	7n	8n	
Контроль, <i>MYCN</i>	39,9±15,1	13,7±4,3	12,3±4,2	11,0±1,5	12,8±2,5	1,8±0,3	6,7±1,3	2,7±0,3
Контроль, <i>MYCC</i>	32,6±4,8	22,4±3,8	8,0±3,9	1,0±0,2	–	–	35,9±15,2	2,9±0,4
NGF, <i>MYCN</i>	61,4±5,0*	8,9±2,6	11,2±4,8	10,7±3,8	7,0±2,2*	0,8±0,1	–*	2,5±0,2
NGF, <i>MYCC</i>	65,5±3,2*	16,4±2,8*	16,4±4,3*	1,6±0,3*	–	–	–*	2,3±0,07*

Примечание: среднее количество копий онкогенов определяли для каждого пациента как отношение суммы произведений численности клеток, содержащих конкретный набор онкогена на число копий онкогена к 100% клеток в каждой серии. Знаком * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия количества копий онкогенов при применении NGF от числа копий онкогенов в контроле

Таблица 3.21

Коэффициент корреляции (r) между средним количеством копий *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов в клетках МБ и индексом цитотоксичности NGF, гибелью клеток в контроле

Серия опыта	df	Онкоген				Индекс цитотоксичности (гибель), %
		<i>MYCN</i>		<i>MYCC</i>		
		среднее количество копий	корреляция, r	среднее количество копий	корреляция, r	
Контроль	7	2,7±0,3	0,27	2,9±0,4	0,03	22,1±2,0
NGF	7	2,5±0,2	-0,33	2,3±0,07*	-0,65* $p < 0,0001$	46,2±3,8*

Примечание: жирным шрифтом обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) значения коэффициента корреляции r при степенях свободы $df = n - 2$. Символом * обозначены статистически значимые отличия от контроля при $p < 0,05$

Результаты, представленные в таблице 3.21, свидетельствуют о наличии статистически значимой ($p < 0,0001$) отрицательной корреляции ($r = -0,65$) между средним числом копий *MYCC*-

онкогена и ИЦ NGF. Этот факт доказывает участие *MYCC*-онкогена в снижении чувствительности клеток МБ к NGF.

Таким образом, действие NGF на клетки МБ статистически значимо снижает ($p < 0,05$) численность клеток, содержащих 6n, 8n копий *MYCN*-онкогена и 3n, 8n копий *MYCC*-онкогена, но вместе с тем увеличивает численность клеток, содержащих диплоидный набор обоих онкогенов. Установлена статистически значимая отрицательная корреляция между средним количеством копий *MYCC*-онкогена в клетках МБ и ИЦ NGF, показывает, что наличие онкогена в клетках опухоли повышает их резистентность к NGF.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Эффекты и механизмы действия фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37 и химиопрепаратов на клетки глиомы C6 и глиобластомы человека

Представленные в разделах 3.1, 3.2 данные о цитотоксической противоопухолевой активности PG-1, LL-37, NGF и химиопрепаратов в отношении клеток глиом C6 и U251 дополняются результатами других исследований. Safdie F. и коллеги (2012) из Южно-Калифорнийского университета (Лос-Анжелес, США) исследовали чувствительность клеточных линий глиом мыши (GL26), крысы (C6) и человека (LN229, A172 и U251) к TMZ (0–8 мМ) в течение 24 ч в среде с низким (0,5 г/л) или нормальным содержанием глюкозы (2,0 г/л) и 1% ЭТС. Процент гибели клеток глиом определяли по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ) после 24 ч действия химиопрепарата (рисунок 4.1).

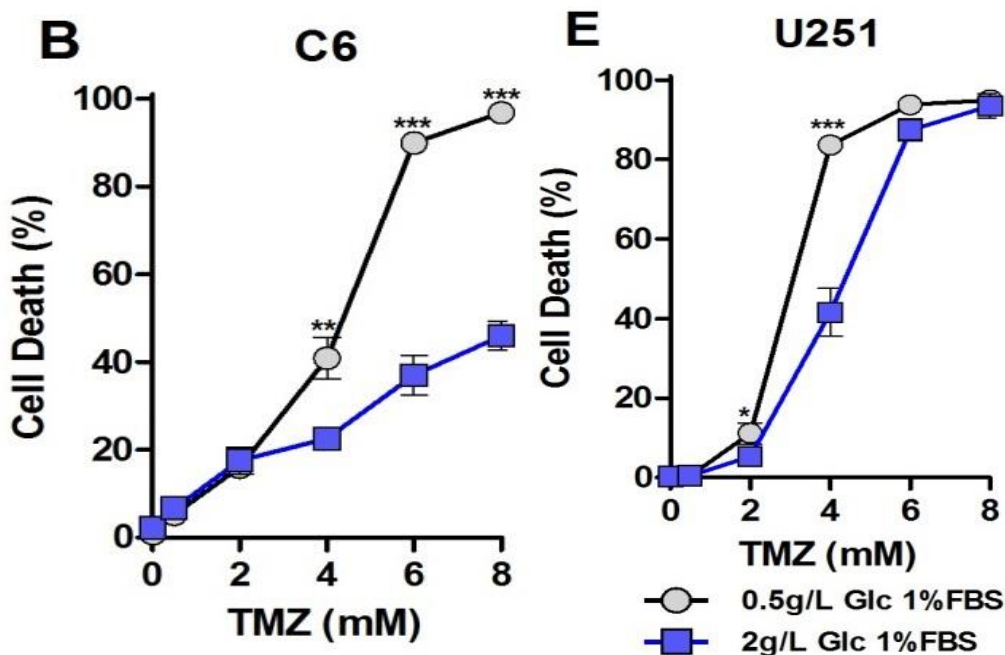


Рисунок 4.1. Чувствительность клеток глиом C6 и U251 к TMZ (0-8 мМ) при 24 ч действии в среде с низким (0,5 г/л) и нормальным (2 г/л) содержанием глюкозы

TMZ – темозоломид, Glc – глюкоза, cell death (%) – гибель клеток в %.

Исследователи показали, что чувствительность клеток глиом к TMZ в 3 раза повышается в условиях культивирования с низким содержанием глюкозы. При этом ИК₅₀ для глиом C6 и U251 составила соответственно 4 и 3 мМ в среде с низким содержанием глюкозы [384]. Эти данные отчасти согласуются с результатами автора, определившего ИК₅₀ TMZ в МТТ тесте (1725,7 мкМ) и в тесте с трипановым синим (1613 мкМ) на клетках U251. Различия в величинах ИК₅₀ для TMZ, полученных на клетках C6 и U251 в работе автора и исследователей из США,

может объясняться различиями в чувствительности используемых методов определения цитотоксичности. С другой стороны, Weiliang He и коллеги из научно-медицинского центра Северо-Техасского университета (Техас, США), изучая чувствительность клеток глиом человека A172, BT325, U251 и U87-MG к TMZ, показали, что химиопрепарат не оказывает цитотоксической активности в отношении клеток A172 и BT325 в дозах менее 40 мкМ, оказывает слабое снижение жизнеспособности клеток U251 в дозе 40 мкМ, но более чем на 30% ее ингибирует в клетках U87-MG в концентрациях 4-40 мкМ (рисунок 4.2) [385]. Авторы для исследования выбрали 10-кратную пиковую дозу TMZ (40 мкМ), наблюдаемую в крови у пациентов при химиотерапии [386].

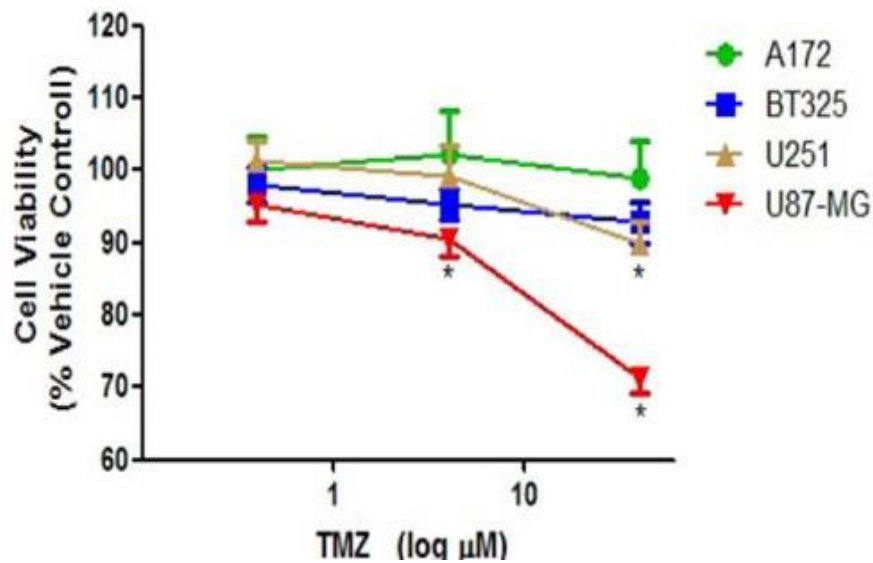


Рисунок 4.2. Изменение жизнеспособности клеток A172, BT325, U251 и U87-MG ГБ человека при действии TMZ (4–40 мкМ) по данным ССК-8 анализа

Cell viability – жизнеспособность клеток, vehicle control % - процент по отношению к раствору в контроле

Известно, что чувствительность клеток глиомы к TMZ зависит от метилирования промотора гена *MGMT* [387]. Исследователи He W. и коллеги связали резистентность клеток U251, A172 и BT325 к химиопрепарату с наличием неметилированного промотора *MGMT* в клетках глиом. Эта гипотеза подтверждается данными по увеличению экспрессии мРНК гена *MGMT* и его белка в клетках U251, обработанных TMZ (100 мкМ) в течение 3-6 сут [388]. Резистентность клеток U251 к TMZ в исследованиях автора (IC_{50} 1613-1725,7 мкМ), вероятно, также может объясняться наличием неметилированного промотора гена *MGMT*. Однако, исследователи Gratas C. и коллеги (2014), проанализировав экспрессию четырех сверхэкспрессирующихся генов: калликреин-родственной пептидазы-5 (*KLK5*), атипичного FAT кадгерина-2 (*FAT2*), хитиназа-3-подобного белка-1 (*CHI3L1*) и гепарин-связывающего EGF-подобного фактора

роста (*HB-EGF*) в клетках глиомы U251TR, обработанных TMZ (250, 350 и 50 мкМ), показали, что экспрессия этих генов также регулируется химиопрепаратом, хотя и в меньшей степени, чем MGMT. При этом у пациентов с ГБ избыточная экспрессия генов *KLK5*, *FAT2*, *CHI3L1* и *HB-EGF* существенно влияет на показатели общей (OS) и бессобытийной (PFS) выживаемости [389]. Ученые из государственного университета Уэйна (Детройт, США) определили ИК₅₀ TMZ (>2000 мкг/мл) и этопозида (6,5 мкг/мл) на клетках U87 ГБ человека [390], значения которых были схожи с таковыми в исследовании автора. Исследователи из Шанхайского университета (Китай) сравнили ИК₅₀ паклитаксела и TMZ при 48 ч их действии на клетки глиом U87 и С6, показав, что клетки глиомы С6 были более чувствительны к химиопрепаратам (0,1 мг/л 28,0 мг/л), чем клетки U87 (4,5 мг/л и 77,3 мг/л соответственно для паклитаксела и TMZ) [391]. Эти данные также согласуются с результатами автора, показавшего большую резистентность глиомы человека U251 к TMZ в 12 раз по сравнению с глиомой С6 крысы. Кроме того, Ху У и соавторы также выявили синергетический эффект комбинации паклитаксела с TMZ в соотношении 1: 5 (дозы 4,0 и 20 мг/л соответственно) на клетках U87 и С6 в дозах 0,05 и 5 мг/л, соотношение 1:100. Дальнейшее увеличение доз химиопрепаратов не давало статистических различий в значениях КИ [391]. Этим же коллективом авторов показано, что устойчивость клеток С6 к TMZ связана с популяцией (74,6%) раковых стволовых клеток (SP), сверхэкспрессирующих ABCB1 (MDR1) белок. Ингибирование ABCB1 повышает чувствительность к TMZ-индуцированному апоптозу в клетках С6 [392].

Литературные данные относительно действия других химиопрепаратов, используемых автором в работе, на клетки глиом С6 и человека не многочисленны. Например, ученые из Тегеранского университета медицинских наук (Тегеран, Иран) сравнили ИК₅₀ CSP, конъюгированного с наночастицами с CSP при 24-48 ч их действии на клетки глиомы С6 по результатам МТТ теста. ИК₅₀ CSP, конъюгированного с наночастицами была меньше (67,7±4,7 мкМ), чем у CSP (99,5±8,8 мкМ), что говорит о выраженной цитотоксической активности CSP, связанного с наночастицами по сравнению со стандартным препаратом [344]. Вместе с тем, значения ИК₅₀ CSP в данном исследовании (99,5±8,8 мкМ) было схоже с величиной ИК₅₀ в работе автора (81,2 мкМ). Однако, другие клеточные линии ГБ человека U373 и T98G оказались более чувствительны к CSP (ИК₅₀ 4±1 и 12±4 мкМ), чем глиома С6 [393]. Напротив, клетки глиомы U251 проявляли большую резистентность к CSP (ИК₅₀ 371,5 и 228,9 мкМ по данным МТТ теста и теста с трипановым синим), чем клетки С6 (ИК₅₀ 81,2 и 82,2 мкМ соответственно для указанных методов). Клеточные линии F98 ГБ крысы оказались более чувствительны к CSP (ИК₅₀ 5,21 мкМ) и карбоплатину (ИК₅₀ 47,5 мкМ) [394], чем клетки С6 (ИК₅₀ карбоплатина 244,1 мкМ). Обращает внимание различие ИК₅₀ в 9,1 раз между препаратами, принадлежащих к одной группе платина-содержащих химиопрепаратов. Интересно, что данное различие, хоть и

менее выраженное (в 3 раза) сохраняется на клетках глиомы С6. По другим данным ИК₅₀ карбоплатина на глиоме С6 составляет 500 мкМ [395], что, вероятно, объясняется различиями в чувствительности используемых методов и продолжительности действия химиопрепарата по сравнению с экспериментами автора. С другой стороны, отличия или сходства в паттернах экспрессии генов, например, белка p53 (*TP53*), глиального фибриллярного кислого белка (*GFAP*) и др. между клетками С6, U251 и F98 могут способствовать различной или одинаковой степени чувствительности этих глиом к химиопрепаратам (таблица 4.1).

Таблица 4.1

Сравнение уровней экспрессии генов в различных линиях глиомы [396].

Profile	C6	U251	U87	GL261	9L/LacZ	CNS-1	F98	RG2
Invasiveness	moderate	low	low	moderate	high	moderate	high	high
Nuclear pleomorphism	+	+	+	+	+	+	+	+
High mitotic index	+	+	+	+	+	+	+	+
Foci of tumour necrosis	moderate	high	high	high	low	moderate	low	high
Angiogenic	high	high	high	high	high	moderate	high	moderate
Immunogenic	+	+	+	-	+	-	-	-
GFAP	-	+	-	+	-	+	+	-
S100	+	+	-	+	+	+	-	-
Vimentin	-	+	+	variable	N/A	+	+	+
Syngenic model existence	+	-	-	+	+	+	+	+
p14 ^{ARF} mutation	-	+	+	+	-	N/A	N/A	N/A
p16 mutation	+	+	+	+	-	N/A	+	+
PTEN mutation	-	+	+	+	-	N/A	N/A	N/A
p53 mutation	-	+	-	+	+	N/A	-	-
KRAS mutation	N/A	+	+	+	N/A	N/A	+	+
EGFR overexpression	+	+	-	+	+	N/A	+	-

Примечание: GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок, PTEN – гомолог фосфатазы и тензина, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, + присутствие, – отсутствие, N/A не установлено, high – высокий, low – низкий, moderate – средний, variable -изменчивый

Клетки глиомы С6 более устойчивы к доксорубину (ИК₅₀ 227 мкМ), чем, например, к этопозиду (ИК₅₀ 11,5 мкМ). При этом степень химиорезистентности клеток С6 коррелирует с уменьшением накопления доксорубина в клетках глиомы, экспрессирующих Р-гликопротеин (АВСВ1 белок) [397]. Аналогичные данные были получены автором, показавшим, что глиома С6 более чувствительна к этопозиду (в 16,6–19,7 раз по данным МТТ и теста с трипановым синим), чем к доксорубину.

Что касается NGF, то, полученные автором результаты на глиоме С6, частично согласуются с данными работы [398], согласно которым экзогенный NGF ($3,37 \times 10^{-9}$ М) к 4-м сут ингибировал численность клеток С6 на $53,4 \pm 5,15\%$ от контрольной и индуцировал признаки

морфологической дифференцировки. Последнее расхождение может быть объяснено различной природой и формой NGF. Авторы работы [398] применяли 7S-форму мышинового NGF, тогда как автором была использована β -форма рекомбинантного NGF. Морфологическую дифференцировку глиомы C6 авторы [398] сочли следствием потенцирования NGF уровня как самого эндогенного белка, так и его рецепторов. Как показали результаты других исследователей [399], NGF является антимитогенным белком лишь в том случае, когда глиома C6 стабильно экспрессирует рецептор TrkA. При взаимодействии NGF с TrkA рецептором наблюдается дифференцировка глиомы C6 в олигодендроциты, поскольку эта клеточная линия представлена двумя основными компонентами – астроцитарным и олигодендроцитарным [400]. Астроциты и астроцитарные глиомы экспрессируют p75 и TrkA рецепторы, тогда как олигодендроциты – p75 и TrkB, хотя те и другие содержат мРНК NGF и выделяют его в межклеточное пространство [401]. Экзогенный NGF усиливает эту секрецию и одновременно через аутокринную систему повышает продукцию своих рецепторов. В работе [402] установлено, что для глиомы C6 имеет место и субклоновая гетерогенность рецепторов: клон C6-2B лишен TrkA, в противоположность C6-2BD12 клеткам, используемым в работе [403], тогда как оба клона содержат p75 рецепторы. Автор также установил, что NGF ($3,37 \times 10^{-9}$ М) обладает цитотоксической активностью в отношении клеток глиомы U251 человека. Имеется и другое мнение [399], согласно которому NGF обладает через связывание с TrkA рецептором рост-стимулирующей активностью в отношении клеток ГБ человека. На примере клеточных линий глиом U373, U251 и U87 показано, что на 3-и сут он дозо-зависимым образом увеличивает численность клеток (соответственно до 133,9 и 16 % по отношению к контролю) с выходом на плато при дозе 100 нг/мл [399]. Zhang Z. и коллеги (2005) с помощью иммуногистохимии показали, что NGF колокализуется с γ -тубулином в центросомах или на полюсах веретена деления, а его TrkA рецептор колокализуется и активирует α -тубулин, что способствует сборке митотического веретена и делению клеток глиомы U251 [404]. Также Liu T-T. и коллеги (2018) из Сычуаньского университета (Чэнду, Сычуань, Китай) с помощью иммуногистохимического окрашивания на 70 образцах астроцитом (GrI-GrIII), полученных от взрослых пациентов и 15 образцах нормальной ткани мозга человека установили, что экспрессия NGF в образцах астроцитом статистически значимо ($p < 0,05$) увеличена по сравнению с нормальной нервной тканью мозга и положительно коррелирует со степенью ($p < 0,05$) злокачественности опухолей [405]. При этом NGF сверхэкспрессируется в цитоплазме и ядрах, а TrkA – в мембране и ядрышках клеток глиомы U251 [406]. Вместе с тем, в других *in vivo* исследованиях, проведенных на ГБ, показано, что NGF через активацию p75 рецептора и изменения цитоскелета стимулирует миграцию клеток и инвазию глиомы [407]. Эти эффекты NGF подтверждаются применением *in vivo* (на мышах) малых интерферирующих РНК (миРНК)

к p75, которые снижают экспрессию мРНК, белка p75 в клетках U251 глиомы и уменьшают объем опухоли; увеличивая продолжительность жизни мышей. При этом уровень экспрессии p75 отрицательно коррелирует с апоптозом и положительно – с экспрессией NGF [408]. Различие эффектов NGF, полученное автором на глиоме U251 и другими исследователями может объясняться использованием разных форм NGF (7S-, β -форма) и его доз. Автор наблюдал цитотоксический эффект NGF при относительно высоких дозах (100–200 нг/мл), тогда как в низких концентрациях (10, 25, 50 нг/мл) NGF обладает митогенной активностью в отношении клеток глиомы U251. Также наблюдаемые различия эффектов могут быть обусловлены чувствительностью используемых методов. Например, автором показано, что NGF имеет различные ИК₅₀ ($2,14 \times 10^{-9}$ и $3,5 \times 10^{-9}$ М) в зависимости от использования МТТ или теста с трипановым синим (таблица 3.2). Кроме того, на разнообразие клеточных эффектов NGF могут оказывать колоколизация его рецепторов – TrkA, p75 и образование их комплексов.

Полученные автором данные свидетельствуют о сильной цитотоксической активности LL-37 и PG-1 в отношении клеток глиом С6 и U251 (таблицы 3.1, 3.2). Опухолевые клетки гибнут путем апоптоза, вследствие нарушения пептидами целостности их мембран, что, вероятно, происходит через G-белок связанный рецептор GPCR и активацию апоптотических факторов: AIF, Вах, Вак, Рума, p53, как показано в клетках НСТ116 колоректального рака [409]. Colle J-H и коллеги (2019) из института Пастера (Париж, Франция) изучили дозо-зависимое односуточное действие LL-37 (0–50 мкМ) и его фрагмента LL₁₇₋₃₂ на жизнеспособность клеток U87G ГБ человека [410]. Авторы, проведя МТТ тест, определили дозу ИК₅₀ LL-37, которая составила 12,5 мкМ (рисунок 4.3).

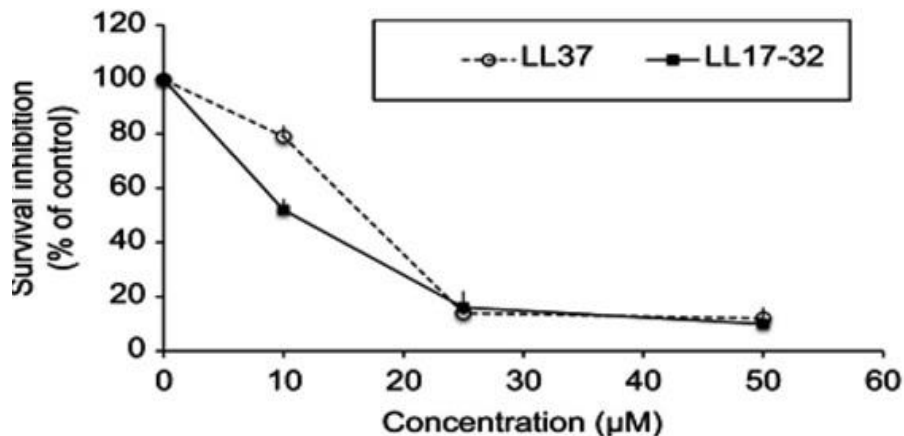


Рисунок 4.3. Дозо-зависимое ингибирование LL-37 и LL₁₇₋₃₂ жизнеспособности клеток глиомы U87 человека [410]

Survival inhibition (% of control) – ингибирование выживания (в процентах от контроля),
concentration (µM) – концентрация, мкМ

Эти данные согласуются с результатами автора относительно значений ИК₅₀ LL-37 (3,1 мкМ), полученными на клетках глиомы U251 человека. Различия чувствительности к LL-37 между глиомами U87 и U251 объясняется отличиями молекулярно-генетических паттернов экспрессии генов и белков в этих клетках. Исследователи Colle J.-H. и коллеги предполагают, что при применении LL-37 может индуцироваться активность протеинфосфоатазы 2A1 (PP2A1), которая ингибирует PI3K/Akt сигнальный путь, участвующий в прогрессии U87G ГБ [411, 412]. Интерес вызывает исследование бразильских ученых из университета Сан-Паулу, изучивших экспрессию 14000 генов при действии LL-37 и ингибированных малыми интерферирующими РНК в клетках SKBR3 рака молочной железы и A375 меланомы человека [413]. Только уровни экспрессии 14 генов (*NAT1*, *TERT*, *PARD6A*, *UTF1*, *HSPA9*, *FGF2*, *HAND1*, *SOX15*, *HNFA4*, *TCF3*, *GDF3*, *NODAL*, *CDC42*, *OLIG2*, *FOXA2*) различались более чем в 1,5 раза по сравнению с контролем [412]. Большинство этих генов экспрессируется в раковых стволовых клетках и ассоциировано с развитием химиорезистентности опухолей. Возможно, что паттерны экспрессии указанных генов также могут влиять на чувствительность клеток глиом к LL-37.

Результаты автора свидетельствуют о наличии у PG-1 выраженной противоопухолевой активности в отношении клеток глиом С6 и U251 (таблицы 3.1, 3.2). На других типах опухолевых клеток показано, что PG-1 индуцирует формирование трансмембранных пор, вызывая внутриклеточный поток Ca²⁺, запускающего активацию белка p53, каспазы-3, ингибитора циклинзависимой киназы 1A (CDKN1A) и ингибирование ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), приводящих к апоптозу [414]. Регуляция этих генов ингибирует прохождение клеточного цикла из G₁ в S-фазу, что блокирует деление раковых клеток и рост опухоли [415].

Таким образом, NGF, LL-37 и PG-1 могут рассматриваться в качестве потенциальных противоопухолевых агентов в отношении клеток глиомы С6 крысы и U251 человека. Кроме того, поскольку LL-37 и PG-1 способны проникать посредством эндоцитоза внутрь опухолевых клеток, они могут представлять интерес как возможные прототипы молекул-переносчиков химиопрепаратов через мембраны опухолевых клеток.

4.2. Эффекты фактора роста нервов на клетках интракраниальных опухолей

Представленные данные о цитотоксической противоопухолевой активности NGF в отношении клетках ПА, АА, ГБ и МБ дополняются результатами других исследователей, показавших разнообразие его эффектов на клетках опухолей мозга. Наряду с превалирующим усилением клеточной гибели [229], наблюдаются и ответы противоположной направленности [62]. Например, NGF в клетках МБ индуцирует дифференцировку [229], макропиноцитоз [235], в

клетках эпендимобластомы – дифференцировку [229], а в нейробластоме — тормозит пролиферацию [30].

Описанные эффекты NGF зависят от: 1) концентрации его в клеточном микроокружении, причем высокие (100 нг/мл и более) дозы NGF индуцируют апоптоз нейробластомы через p75 рецепторы, а низкие (1–10 нг/мл) – стимулируют дифференцировку через TrkA рецепторы [224]; 2) экспрессии рецепторов, TrkA/p75 на мембранах опухолевых клеток. Сверхэкспрессия TrkA в отсутствие p75 на нейробластомах индуцирует пролиферацию и способствует их озлокачествлению [241]; среднее его количество стимулирует клетки к дифференцировке. Высокое соотношение TrkA/p75 рецепторов стимулирует нейритогенез, а низкое – апоптоз [230, 416]; 3) экспрессия TrkA и p75 рецепторов изменяется в зависимости от фаз цикла: присутствие первого рецептора доминирует в раннюю G₁ и M фазы, а p75 – в позднюю G₀, S и G₂ фазы цикла [417]. Активация TrkA и p75 рецепторов стимулирует пролиферацию и выживаемость клонов SH-SY5Y нейробластомы, наблюдающуюся в G₁ и S, G₂/M фазах после 18 ч действия NGF [417, 418].

К иным причинам, предопределяющим разнонаправленность действия NGF на клетки опухолей, относятся:

- 1) степень морфологической гетерогенности опухолей [416].
- 2) степень злокачественности и клиническая стадия опухоли [419].
- 3) плоидность [420] и исчезновение гетерозиготности [5].
- 4) тип подложки и степень насыщенности питательной среды ЭТС, которая создает условия взаимодействия NGF с находящимися в ней ростовыми факторами [421].

С другой стороны, жизнеспособность нейронов обуславливается ингибирующим влиянием NGF через TrkA рецепторы [234].

Кроме того, при прогрессии опухоли наблюдается не только экспрессия рецепторов и их взаимодействие, но и появление абберрантно сплайсированных форм рецепторов. На клетках нейробластомы обнаружены абберрантные TrkAIII рецепторы [23, 421] или EGFRIII [421], лишенные цитоплазматических доменов и способные к автофосфорилированию в отсутствие лигандов, запуская иные сигнальные пути, чем TrkA рецепторы [421], или, действуя как «ловушки» NGF [230, 416]. В опухолях обнаружена транслокация At (1;3) (q21, q11) и инверсия локуса плеча 1q гена *TRKA* [422]. Указанные изменения ассоциированы с аномальной активностью рецепторов через PI3K/АКТ/NF-κB путь вместо Ras/MAPK, запускаемого через TrkA рецепторы [23]. Эти изменения обеспечивают чрезмерную продукцию ростовых факторов клетками опухолей посредством авто- и паракринного механизма положительной обратной связи, что усиливает их рост [423].

Таким образом, различия чувствительности клеток интракраниальных опухолей к химиопрепаратам определяются активацией ими различных каскадов сигнальной трансдукции, экспрессией белков МЛУ и нахождением клеток в разных фазах клеточного цикла. При цитотоксическом действии NGF наблюдаются различные формы гибели (апоптоз, некроз, аутофагия, макропиноцитоз) клеток интракраниальных опухолей.

4.3. Комбинированное действие ростовых факторов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетки интракраниальных опухолей

Приведенные данные об действии комбинаций NGF с химиопрепаратами на клетки интракраниальных опухолей ставят вопрос о механизмах их действия. Например, активность комбинаций CSP с NGF в отношении клеток высокозлокачественной глиомы, эпендимобластомы и МБ подтверждает работа [424], где в результате действия NGF блокируется пролиферация и индуцируется фенотипическая конверсия опухолевых клеток в нейробласты за счет стимуляции дифференцировки и гена раннего реагирования гомолога-К онкогена *v-MAF* мускулоапоневротической фибросаркомы (*MAFK*). В результате применения CSP наблюдается активация генов-супрессоров опухолей *P63*, *P73* и апоптоз. Показано, что при использовании NGF через связывание с рецептором на опухолевых клетках изменяется цитотоксическое действие химиопрепаратов [31, 229]. Исследователи [31], напротив, продемонстрировали, что взаимодействие TrkA с p75 рецептором и образование их гетерокомплексов повышает чувствительность клеток крысиной феохромоцитомы PC12 к CSP и доксорубину, тогда как экспрессия TrkA рецептора способствует резистентности клеток к химиопрепаратам, а коэкспрессия TrkA с TrkB рецептором – усиливает злокачественность опухоли.

Неизученным остается данный вопрос относительно глиальных опухолей. Присутствие транслокации At(1:3)(q21q11) и инверсии в гене *TRKA* рецептора может ассоциироваться с изменением химиочувствительности опухолевых клеток, что, отчасти объясняет противоречивость эффектов, реализуемых через данный рецептор [422]. Выявление эффектов комбинаций NGF с химиопрепаратами может явиться базой для разработки и создания протоколов замещающей цитотоксической химиотерапии у онкологических пациентов. Например, в одном исследовании пролечено 280 человек в возрасте от 6 мес. до 20 лет с нейробластомой, МБ, нейрофибросаркомой комбинациями химиопрепаратов с гранулоцитарно-колониестимулирующим (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим (GM-CSF) факторами (5 мг/кг веса/сут), в результате чего наблюдалось сокращение периода нейтропении и уменьшалась частота инфекций [5, 193]. В другой работе [265] изучены концентрации циркулирующего в крови NGF у 23 пациентов с мелкоклеточным раком легкого, молочной железы, яичников, желудка при химиотерапии CSP, карбоплатином, гемцитабином,

виrolелмином. Установлено, что снижение уровня NGF коррелирует с повышением нейротоксичности организма, индуцируемой химиопрепаратами [32].

До настоящего времени отсутствуют исследования по изучению активности LL-37 и PG-1 в комбинации с химиопрепаратами в отношении клеток опухолей мозга. Автором обнаружено синергетическое действие комбинаций PG-1 и LL-37 с этопозидом на клетки глиомы C6 и U251 человека соответственно (таблицы 3.8, 3.10). Кроме того, синергетическим действием обладали комбинации PG-1 с карбоплатином, доксорубицином и CSP на клетках глиомы C6 (таблицы 3.8). Аддитивный эффект наблюдался для комбинаций PG-1 с TMZ и доксорубицином на клетках глиомы C6 и U251 человека соответственно (таблицы 3.9, 3.13). На клетки эритромиелолейкоза K562 человека показано, что PG-1 оказывает синергетическое цитотоксическое действие в комбинациях с доксорубицином, актиномицином D или полимиксином В, в которых индуцируется как некроз, так и апоптоз [425].

Таким образом, комбинированное применение ростовых факторов и PG-1 с химиопрепаратами, представляется одним из направлений повышения эффективности химиотерапии интракраниальных опухолей.

4.4. Жизнеспособность клеток нормальной нейроглиальной ткани аутопсийных образцов мозга человека

Поскольку при изучении действия NGF и его комбинаций с химиопрепаратами на нормальную нейроглиальную ткань объектом служили аутопсийные образцы ткани мозга лиц, скоропостижно скончавшихся в результате причин, не связанных с мозговой патологией, следует оговорить возможность использования аутопсийного материала в биомедицинских целях. Она предусматривает раскрытие ряда вопросов. Насколько эта идея применима в практике? Какова жизнеспособность клеток в аутопсийной ткани мозга?

Выделение и получение клеток микроглии, астроцитов, олигодендроцитов и нейронов из мозга внезапно умерших лиц широко применяется в нейробиологии [320, 323, 426] при выяснении механизмов старения, нейродегенеративных заболеваний Альцгеймера [323, 427, 428], Паркинсона [427], множественного рассеянного склероза [325], психических состояний, таких как шизофрения [325]; а также при необходимости идентификации свойств плюропотентных стволовых клеток [429], изучения фагоцитоза, адаптивных воспалительных реакций, экспрессии и секреции цитокинов и ростовых факторов [430, 431]. Объектом служит материал, полученный из различных областей и структур головного мозга: фронтальная, височная, париетальная, зрительная и обонятельная кора, гипоталамус, базальные ядра, таламус [325], полосатое тело, черная субстанция [427], мозолистое тело [325], изъятые непосредственно после смерти пациентов в клинике [322, 325, 429], либо предоставленные специализированными банками аутопсийной мозговой ткани Нидерландов (Netherlands Brain

Bank) [428], Европы (BrainNet Europe) [427] и США (Sun health Research Institute Brain Bank) [426].

Жизнеспособность выделяемых клеток по результатам МТТ, окрашивания на кальцеин и зеленым флуоресцентным красителем нуклеиновых кислот – SYTO-10 составляет 77% и 82,1% соответственно [426]. Наличие клеток в аутопсийном материале подтверждается выходом из эксплантов их в количестве от 1,17 до 37 млн./г ткани [322]. На нормальное функционирование мозговых клеток, выделенных из аутопсийного материала, указывает также:

1) экспрессия в них комплекса маркеров жизнеспособных клеток, таких как: фосфат-активированная глутаминаза, глутаматдекарбоксилаза, холинацетилтрансфераза, ацетилхолин, глиальный фибриллярный кислый белок, фибронектин [426], цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа, нейрональный маркер гексарибунуклеотид-связывающий белок-3 – NeuN [325] и полиолигопептидаза [427];

2) секреция в среду интерлейкинов (IL): IL-1 α , IL-1 β , IL-1-ra, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18; TNF- α , глией производимого нейротрофического (GDNF), трансформирующих факторов- β (TGF- β ₁, TGF- β ₂, TGF- β ₃) [430, 431]; хемокинов: CCL-1, CCL - 2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-7, CCL-8, CCL-19, CCL-20; CXCL-1, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, CXCL-12, CXCL-13, CX3CL1 [432], причем все количественные показатели не отличаются от показателей в нормальных клетках мозга [426, 427, 428].

Однако, на жизнеспособность нейроглиальных клеток аутопсийных образцов влияет множество условий:

1) время от момента смерти, составляющее по различным данным от 2–4 [325,426], 3–10 [433], 10–12 [323] до 22–24 ч [427]; 2) возраст умерших [325], предопределяющий различный профиль экспрессии генов ростовых факторов, цитокинов и их рецепторов у детей и взрослых [323, 430, 431]; 3) отсутствие причинной связи смерти с любой формой патологии головного мозга – травмами, опухолями, воспалением, инсультами, неврологическими, психическими, нейродегенеративными, демиелинизирующими заболеваниями, наркоманией, применением транквилизаторов и других [323, 325]; 4) условия культивирования клеток *in vitro*. В частности механический, энзиматический способы разделения [323] или иммуномагнитная сортировка на ДНК-связывающей основе [426]. Применяемые ферменты, их концентрации и время действия [323]. Одни авторы используют трипсин (0,0025–0,25%) и ДНКазу (50–100 мкг/мл) в течение 15–90 мин [433], другие – папаин (2,5 ед/мл) и ДНКазу (1 ед/мл) [323]. Реакция среды (pH) мозговой ткани должна быть нейтральной (pH=7,0) или слабокислой (pH=6,42–6,48) [322, 325], без развития лактоацидоза [322]. 5) тип клеток, выделяемый из образцов аутопсийного мозга и продолжительность их культивирования. Клетки микроглии опережают в скорости прикрепления к субстрату и пролиферации (7 сут) астроциты, олигодендроциты и нейроны,

растущие в течение 28–30 сут [323, 431]. Таким образом, приведенные выше сведения литературы доказывают целесообразность использования аутопсийного материала в биомедицинских исследованиях, подтверждают жизнеспособность нейроглиальных клеток из аутопсийных образцов мозга и указывают на факторы, влияющие на результаты экспериментов.

4.5. Анализ типов гибели клеток интракраниальных опухолей при действии фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами

Проведенный автором проточно-цитометрический анализ типов гибели клеток глиомы U251 человека с помощью флуоресцентных ДНК-связывающих красителей PI и YO-PRO-1 позволил установить, что синергетический цитотоксический эффект комбинации PG-1 с этопозидом наблюдается в результате активации гибели клеток по типу апоптоза и некроза (рисунок 3.18). Результаты автора согласуются с данными исследователей [434], показавших с помощью проточно-цитометрического анализа FITC-меченного аннексина V, что двухсуточное действие этопозида дозо-зависимо (24, 48 и 96 мкг/мл) индуцирует ранний апоптоз соответственно в $19,20 \pm 2,13\%$, $28,56 \pm 3,28\%$ и $41,25 \pm 5,92\%$ клеток глиомы U251 (рисунок 4.4).

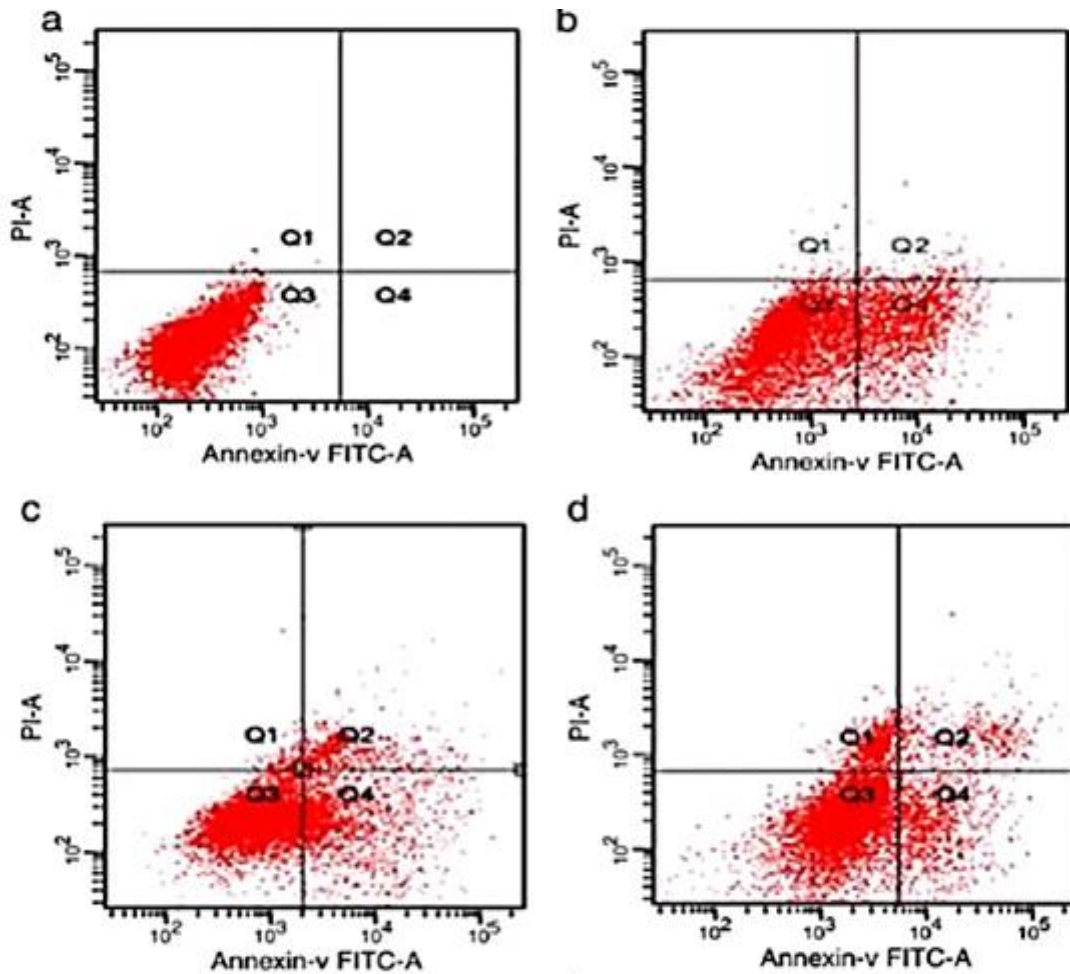


Рисунок 4.4. Проточно-цитометрический анализ типов гибели клеток глиомы U251 по окрашиванию FITC-меченым аннексином-V при 2-сут действии этопозида в дозах 24 (Б), 48 (В) и 96 мкг/мл (Г) по сравнению с контролем (А) [434]

Вместе с тем, авторы установили, что действие этопозиды в тех же дозах индуцирует апоптоз только в $12,43 \pm 1,93\%$, $20,73 \pm 3,83\%$ и $29,84 \pm 4,76\%$ CD133⁺-стволовых клеток глиомы U251, показывая, что стволовые клетки более химиорезистентны по сравнению с клетками глиомы U251, возможно, за счет увеличения ($p < 0,05$) экспрессии мРНК *ABCC1* и ливина- β . Японскими учеными Katayama M. и коллеги (2007) установлено, что клетки глиомы U251 могут проявлять резистентность к действию этопозиды и TMZ за счет увеличения продукции АТФ при индукции аутофагии. Ингибирование синтеза АТФ при действии ингибиторов аутофагии: 3-метиладенина (3-MA), малых интерферирующих РНК к беклину-1 или олигомицина увеличивает гибель клеток глиомы [435]. Эти результаты показывают, что под действием этопозиды и TMZ наблюдается индуцированный аутофагией выброс АТФ, который защищает клетки глиомы и может способствовать их МЛУ. Исследовали из Стенфордского университета (США), проведя проточно-цитометрический анализ с использованием красителей CellTiterBlue, 2',7'-дихлорфлуоресциндацетата (DCFDA), кальцеина-AM, PI, МТТ, глутатион-окислительно-восстановительного потенциала (GSH), Bodipy.FL.L-цистина (BFC), определили наиболее подходящий краситель для оценки апоптоза клеток глиом LN229 и MDA-MB-231 к метотрексату (0, 5, 10 и 20 мкМ), паклитакселу (0, 25, 50 и 100 нМ) и этопозиду (0, 6,25, 12,5 и 25 мкМ). Авторы установили, что гибель клеток обеих линий при использовании PI и GSH красителей сильно зависит от дозы паклитаксела и этопозиды ($R^2 = 0,9$). По сравнению с PI, использование BFC проявляет лучшую корреляцию ($R^2 = 0,7-0,9$) при оценке жизнеспособных и апоптотических клеток [436]. При проведении электронно-микроскопического исследования установлено наличие различных типов гибели клеток ПА и МБ в результате действия химиопрепаратов, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами. Анализ электронно-микроскопических критериев типов гибели опухолевых клеток позволяет ответить на вопросы: какие типы гибели клеток и при применении каких химиопрепаратов являются наиболее разрушительными? Какие из внутриклеточных структур являются в наибольшей степени уязвимыми или устойчивыми к применению химиопрепаратов, NGF и его комбинаций? Причинами гибели опухолевых клеток, кроме действия химиопрепаратов, служат: отсутствие в опухолевом окружении ростовых факторов, усиливающих митогенную активность опухолей; приобретение клоном опухоли устойчивости к химиопрепаратам [14, 115].

4.6. Потенциальные маркеры чувствительности, резистентности интракраниальных опухолей к фактору роста нервов и химиопрепаратам

4.6.1. Применение интерлейкина-6 в качестве прогностического маркера злокачественности и химиорезистентности интракраниальных опухолей

Экспериментальные исследования по определению уровня секреции ИЛ-6 клетками ПА, эпендимомы, АА, ГБ и МБ в результате применения химиопрепаратов и NGF, изложенные в

главе 3, ставят на вопросы: может ли IL-6 служить маркером агрессивности опухолей мозга? Является ли IL-6 маркером прогноза химиочувствительности клеток интракраниальных опухолей? Результаты автора дополняют данные литературы об иных типах рака или с привлечением других, не использовавшихся в работе химиопрепаратов. Результаты автора согласуются с исследованиями, в которых показано постадийное увеличение секреции IL-6 клетками аденокарциномы яичника [42], сопряженное с активацией JAK/STAT-3 [41, 42, 437], p42/p44МАРК и PI3K/АКТ каскадов [438] и эпигенетической регуляцией IL-6 [439]. Увеличение секреции IL-6 установлено у пациентов с метастатической карциномой молочной железы относительно клеток недиссеминированной опухоли [440, 441]. В иной публикации [442] показана слабая экспрессия IL-6 или ее отсутствие в низкоккачественных астроцитомах, олигодендроглиомах, эпендимоммах и высокая экспрессия у пяти из девяти пациентов с ГБ, что связано со стимуляцией транскрипции мРНК IL-6 и его секрецией. Данная корреляция подтверждается экспериментами на клеточных линиях U251 и T98G ГБ человека [445], метастатической карциномы молочной железы [440, 441] и свидетельствует об участии IL-6 в трансформации клеток.

В литературе на культуральной модели хронического лимфолейкоза установлено, что сильные корреляции ($r=0,52-0,57$) наблюдаются между действием идентичных по механизму действия химиопрепаратов (циклофосфамид, доксорубин и винкристин), а также кортикостероидов и этопозида. Тогда как, более слабые корреляции ($r=0,30-0,49$) определены для винкристина, дексаметазона и цитарабина. Слабая отрицательная корреляция наблюдается между количеством пролиферирующих клеток лимфолейкоза и их чувствительностью к доксорубину и этопозиду [110].

Показано, что при применении доксорубина (1,0 мкг/мл) наблюдается усиление секреции IL-6 клетками глиом человека U251 и T98G, ассоциированная с амплификацией гена IL6 [445]. В результате действия доксорубина наблюдается активация экспрессии и секреции IL-6 через PI3K/АКТ, RAS/МЕК пути, транскрипционные факторы: сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции каскад (STAT-3) [42, 443], NF-κB [41, 444] клетками рака яичника [42] и желудка [446]. Секреция IL-6 изучена на клетках множественной лейкемии, почечной карциномы, холангиокарциномы, рака простаты, молочной железы, желудка [440, 441], яичника [447] и почек [448]. В этих исследованиях секреция IL-6 ассоциирована с усилением химиорезистентности опухолей к CSP, паклитакселу [449], доксорубину при снижении протеолитической активности каспазы-3, усилении экспрессии гена МЛУ (*MDR1*), глутатион-S-трансферазы, белков-ингибиторов апоптоза *Bcl-2*, *Bcl-xl* *XIAP*, сигнальных каскадов: PI3K, RAS/ERK [449], JAK/STAT-3 [42, 437], транскрипционных факторов NF-κB, Forkhead [41] и *MYC*-онкогена [42]. В тоже время экспрессия IL-6 ассоциирована с устойчивостью клеток

меланомы к CSP и экспрессией циклинов D₁, D₂ и B₁, MYC-онкогена, генов основного фактора роста фибробластов *BFGF* [437] и *VEGF* [443, 437]. Указанные события приводят к торможению апоптоза и усилению пролиферации, инвазии и метастазированию опухоли [52]. Уровень IL-6 также коррелирует с инвазивностью и метастазированием клеток U251 и T98G ГБ человека, а также усилением экспрессии фасцина-1 [445], молекул межклеточной (ICAM-1) и сосудистой (VCAM-1) адгезии на эндотелиоцитах сосудов [450]. Пролиферация клеток ГБ сочетается с воспалением, стимуляцией клеток иммунной системы и секрецией ими TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 и IL-10 [451].

Раскрытие молекулярных механизмов взаимодействия опухолевых клеток и стромы позволит разработать противоопухолевые препараты нового класса, ослабляющие протекторный эффект опухолевого микроокружения путем ингибирования паракринного синтеза IL-6 и VEGF [52].

Связь IL-6 и NGF обозначена в одной публикации [452], показывающей, что при применении NGF стимулируется IL-6 -потенцируемый нейритогенез клетками крысиной феохромоцитомы PC12 через синтез нейрофиламентов-L и -M и глиального фибриллярного кислого белка в астроцитах [453]. Вместе с тем, IL-6 оказывает протекторное действие на лейкозные клетки в условиях их обеднения сывороточными факторами [52].

Кроме того, чувствительность к IL-6 тканей организма, в т.ч. интракраниальных новообразований, определяется присутствием и соотношением на их клетках растворимого, усиливающего биологические эффекты IL-6R рецептора и ингибирующего биологические эффекты IL-6 gp130 рецептора [454]. Если IL-6, связывается с gp130 на клетках астроцитомы U373MG, то наблюдается активация транскрипции протеин-тирозинфосфатазы (РТР), способствующей их аксональной проводимости, нейритогенезу [455] и дифференцировке через экспрессию глиального фибриллярного кислого белка в астроцитах зрительного нерва и сетчатки [456]. Таким образом, с помощью данных маркеров устанавливается взаимосвязь воспалительных, иммунных реакций и нейритогенеза, дифференцировки нормальных глиальных и клеток глиальных опухолей [457].

Встает вопрос: каким образом уровень секреции IL-6 клетками интракраниальных опухолей коррелирует с его концентрацией в сыворотке крови пациентов с данной патологией? Исследователи [458] показали, что количество IL-6 у здоровых доноров ($65,5 \pm 22,6$ нг/л) и у пациентов с глиомами ($71,5 \pm 30,1$ нг/л) совпадает с диапазоном его секреции *in vitro* клетками ПА и эпендимомы, что согласуется с исследованиями автора [459]. Следовательно, уровень секреции IL-6 может рассматриваться в качестве диагностического маркера агрессивности и химиорезистентности высокозлокачественных интракраниальных новообразований (АА, ГБ и МБ) у человека.

4.6.2. TrkA, p75 рецепторы как маркеры интракраниальных опухолей к таргетному действию фактора роста нервов и его комбинаций с цисплатином и темозоломидом

В свете развития нового направления медицины – таргетной терапии, рецепторы NGF (TrkA, p75) могут рассматриваться в качестве мишеней активаторов и ингибиторов для более избирательного цитотоксического действия на клетки опухолей мозга. Определение экспрессии данных рецепторов в клетках интракраниальных неоплазий при применении NGF и его комбинаций с химиопрепаратами ставит вопросы: о количестве клеток интракраниальных опухолей, экспрессирующих TrkA и p75 рецепторы и о их взаимосвязи с чувствительностью к химиопрепаратам.

Рецепторы NGF экспрессируются на клеточных линиях MED-3, MED-L, MED-H, D283MED, DAOY МБ [240]; SH-SY5Y [30, 230], SMS-KCN, KP-N-SIFA, MP-N-TS нейробластомы [224, 251]; первичных клетках, полученных из операционного материала [224, 227, 228, 229, 241], в том числе на МБ [225]. Результаты автора по оценке экспрессии рецепторов на клетках АА, ГБ и МБ, подтверждает публикация [6], в которой методом иммуногистохимии установлена экспрессия TrkA и TrkB рецепторов на клетках ПА, АА и ГБ, полученных из операционного материала 10 взрослых пациентов.

Экспрессия TrkA, TrkB, TrkC рецепторов на клетках нейробластомы и МБ служит ранним диагностическим маркером благоприятного или неблагоприятного их прогноза [31].

Аналогичная картина отмечена для p75 рецептора [26, 231]. Сверхэкспрессия p75 рецептора наблюдается в клетках узловой (десмопластической) МБ [460] и ассоциирована с усилением апоптоза через стимуляцию p53/JNK/церамидного каскада и стимулированием активности каспаз в BE(2)C-клоне нейробластомы [461]. Другие исследователи, напротив показывают ингибирование экспрессии p75 рецептора в МБ при применении NGF [6]. Установлена корреляция между экспрессией p75 рецептора и инвазией, миграцией клеток МБ [462] и ГБ [256, 257], метастазированием ГБ [257], выживаемостью клеток феохромоцитомы PC12 крысы через циклин-D2–зависимый механизм [463], повышением концентрации Ca²⁺ в нейронах и протекцией дегградации митохондрий [464]. Известно, что p75 и TrkA рецепторы регулируют функции друг друга, их коэкспрессия усиливает аффинность и специфичность TrkA рецептора к NGF [236, 242] или они образуют общий комплекс с повышенной специфичностью и аффинностью к NGF [242, 465].

Разнородность мнений соответствует разнонаправленности эффектов p75 рецептора [231, 464]. В одних случаях экспрессия p75 рецептора, как белка семейства TNF- α , ассоциирована с ингибированием пролиферации опухоли и усилением апоптоза [464]. В других – экспрессия p75 рецептора связана с активацией пролиферации [30, 236] или выживанием опухолевых клеток [222], а не с апоптозом [240].

Выполненный автором корреляционный анализ между TrkA/p75 и ИЦ NGF, его комбинаций с химиопрепаратами позволяет положительно ответить на поставленные вопросы: как TrkA/p75 рецепторов ассоциировано с чувствительностью клеток АА, ГБ и МБ к химиопрепаратам, NGF и их комбинациям? Может ли TrkA/p75 служить новым тергетным маркером прогнозирования ответа химиотерапии у онкологических пациентов?

По мнению исследователей [30, 55, 236] изменение TrkA/p75 рецепторов на клетках высокозлокачественных опухолей указывает на образование гетерокомплекса TrkA-p75 с повышенной специфичностью и аффинностью к NGF [466].

4.6.3. *MYCC-, MYCN-онкогены как маркеры интракранальных опухолей к таргетному действию фактора роста нервов*

Проведенные автором исследования по изучению численности копий *MYCN* и *MYCC*-онкогенов в клетках МБ ставят вопросы: могут ли *MYCN*- и *MYCC*-онкогены рассматриваться в качестве новых генетических таргетных мишеней прогнозирования исхода терапии у пациентов с МБ? Может ли численность *MYCN* и *MYCC*-онкогенов являться фактором химиорезистентности клеток МБ? Как действие NGF изменяет численность копий *MYCN* и *MYCC*-онкогенов в клетках МБ?

В настоящее время амплификация и экспрессия *MYCC*-, *MYCN*- онкогенов признана Международным обществом детской онкологии Европейского комитета по примитивной нейроэктодермальной опухоли (SIOP Europe PNET) в качестве официального молекулярного диагностического и прогностического маркера эмбриональных опухолей у детей [39, 248]. Установлено, что активация *MYCN*-онкогена в нейробластомах ассоциирована с агрессивностью опухолей и низким (13%) показателем пятилетней общей выживаемости онкологических пациентов [254], которые в основном умирают в течение одного месяца [55]. При исследуемой патологии установлена корреляция риска летального исхода от численности копий онкогенов: в 3,5 раза увеличивается вероятность смерти при повышении количества на каждые 10 копий для *MYCC* и в 1,7 раза – для *MYCN* онкогена [48].

Дискуссионный характер носят данные, касающиеся корреляций NGF и его рецепторов с уровнем экспрессии *MYCC*, *MYCN*-онкогенов. Одни исследователи наблюдают взаимосвязь между изменением химиочувствительности клеток нейробластомы и экспрессией TrkA, p75 рецепторов и *MYCC*, *MYCN*-онкогенов. Например, обнаружено подавление экспрессии TrkA-рецептора на клетках LA1-15N, SMS-KCNR нейробластом с *MYCN*-амплификацией [40, 224]. При применении NGF в течение 1 ч и 1 сут наблюдается через TrkA рецептор ингибирование на 50–60% и 80% экспрессии *MYCN*-онкогена в клетках указанных линий, возможно, через ингибирование АКТ/ПКВ/Ras сигнального пути или киназы фокальной адгезии pp125FAK [40]. Эти результаты подтверждаются тем, что высокая экспрессия TrkA рецептора у четырех

пациентов с нейробластомой, содержащих *MYCN*-амплификацию, коррелирует с благоприятным клиническим прогнозом и безрецидивной продолжительностью жизни до 31-го месяца [224, 232]. Вместе с тем констатируется отсутствие зависимости между активацией *MYCC*-онкогена в МБ и его амплификацией (копийностью), которые происходят через различные, пока не изученные механизмы [250]. Имеются данные об ингибиторной активности NGF через TrkA рецептор, MAPK, циклин-E2-киназу, ингибитор циклин-зависимой киназы – p27kip1 и транскрипционный фактор E2F на экспрессию *MYCN*-онкогена в клетках нейробластомы [40]. Сверхэкспрессия TrkA рецептора на нейробластомах и МБ подавляет агрессивный рост опухолей даже с *MYCN*-амплификацией [224]. Взаимодействие NGF и *MYC*-онкогенов может происходить и по другому сценарию. В результате применения NGF через TrkA рецептор и MAP-2 наблюдается активация Krüppel-подобного транскрипционного фактора (KLF-7), аутофагии и дифференцировки клеток PC12 феохромоцитомы крысы [159]. Аналогичный тип гибели установлен в клетках МБ [227]. Вместе с тем экспрессия KLF-7 усиливает синтез белков cip/kip семейства ингибиторов циклин-зависимых киназ p21waf/cip и p27/cip1 [467] в коре мозга и гиппокампе крысы. Именно эти ингибиторы подавляются в результате активации *MYCC*-онкогена [253]. Таким образом, можно предположить, что действие NGF через TrkA рецептор, ингибиторы p21waf/cip и Krüppel-подобный фактор-7 будет ассоциироваться со снижением активности *MYCC*-онкогена и стимуляцией дифференцировки или аутофагии клеток МБ.

Профессор А. И. Свирновский полагает, что: «если иметь в виду индуцибельность экспрессии белков *MYCC*, *MYCN*-онкогенов, то выраженность ответа опухолевых клеток *in vitro* на различные цитостатические средства по этому показателю может оказаться дополнительным к непосредственному определению химиочувствительности фактором прогнозирования действия того или иного препарата в организме» [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют заключить, что NGF, LL-37 и PG-1 обладают выраженной противоопухолевой активностью, даже превосходящей по показателям эффективность действия химиопрепаратов на клетки глиомы С6 крысы и глиомы U251 человека *in vitro*. Кроме того, показатели цитотоксической активности NGF в отношении клеток ПА и АА сопоставимы с показателями, характеризующими противоопухолевое действие химиопрепаратов, или превышают их в случае клеток ГБ и МБ.

Для комбинаций PG-1 с карбоплатином, доксорубицином, цисплатином и LL-37 с этопозидом установлен синергизм их цитотоксической активности в отношении клеток глиомы крысы С6. Тогда как в отношении клеток глиомы U251 человека синергизм цитотоксического действия проявляет только комбинация PG-1 с этопозидом. При сочетанном действии NGF с химиопрепаратами также наблюдается повышение цитотоксической активности в отношении клеток ПА и АА, ГБ и МБ пациентов. Вместе с тем клетки опухолей пациентов обладают персонифицированной чувствительностью к химиопрепаратам, что позволяет сравнивать по значению ИЦ действие и выбрать наиболее эффективный химиопрепарат для конкретного пациента.

Совместное использование NGF с химиопрепаратами оказывает *in vitro* действие, снижающее цитотоксический эффект химиопрепаратов в отношении клеток нормальной нейроглиальной ткани мозга. На основании этих данных можно заключить, что комбинированное применение NGF с химиопрепаратами позволяет снизить дозу химиопрепарата, при сохранении цитотоксического эффекта в отношении клеток опухолей при менее токсичном действии на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга.

Данные о цитотоксической активности LL-37 и PG-1, NGF и их комбинаций с химиопрепаратами на клетки глиом С6, U251 и NGF и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки интракраниальных опухолей человека позволяют рассматривать NGF, LL-37 и PG-1 и их комбинации с химиопрепаратами в качестве потенциальных препаратов для дальнейших доклинических и клинических испытаний. Проведенное исследование эффектов NGF (уровень секреции IL-6, типы гибели клеток, число копий *MYCC*, *MYCN*-онкогенов), комбинаций NGF с химиопрепаратами (типы гибели клеток, уровень экспрессии TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75) на клетках ПА, АА, ГБ, МБ и пептидов PG-1, LL-37 (исследование характера клеточной гибели и др.) на клетки глиомы U251 предоставляет важную информацию для разработки таких противоопухолевых препаратов.

Проведение стратификации у 18 пациентов с медуллобластомой по группам риска, определяющим интенсивность и продолжительность химиотерапии на основе оценки амплификации *MYCC*, *MYCN* онкогенов FISH анализом, внедрено в клиническую практику Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Обнаружение амплификации в 22,2% пациентов с МБ и данные по общей выживаемости у пациентов с МБ (выживаемость у пациентов с наличием амплификации составляет – 0%, а у пациентов без амплификации – 68%), свидетельствуют о высокой корреляции между данными показателями и эффективностью терапии. Это позволяет рекомендовать оценку амплификации *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов у пациентов с МБ в качестве молекулярно-генетического критерия (маркера) прогнозирования исхода терапии.

ВЫВОДЫ

1. Фактор роста нервов (NGF), кателицидин LL-37 и протегрин PG-1 проявляют *in vitro* цитотоксическую активность, превосходящую по показателям активность химиопрепаратов в отношении клеток глиом C6 и U251. Кроме того, NGF демонстрирует *in vitro* цитотоксическую активность, сопоставимую с действием химиопрепаратов, в отношении клеток пилоцитарной, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека. Полученные данные позволяют рассматривать NGF и пептиды в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов для терапии опухолей головного мозга.

2. Для комбинаций PG-1 с карбоплатином, доксорубицином, цисплатином, этопозидом, а также LL-37 с этопозидом, выявлен синергизм цитотоксического действия на клетки глиом C6 и U251 *in vitro*. Цитотоксическая активность NGF в комбинации с химиопрепаратами была существенно выше активности индивидуального препарата NGF в отношении клеток медуллобластомы, в то время как показатели активности комбинаций NGF с химиопрепаратами в отношении клеток пилоцитарной и анапластической астроцитомы были сопоставимы с показателями обособленного действия NGF, а для клеток глиобластомы даже несколько более низкими. Полученные результаты дают основание рассматривать комбинации NGF, PG-1, LL-37 с химиопрепаратами в качестве потенциальной схемы для комбинированной терапии определенных типов опухолей мозга у пациентов.

3. NGF и семь из восьми его комбинаций с химиопрепаратами оказывают *in vitro* эффекты, снижающее токсическое действие химиопрепаратов на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга. Вместе с тем, по сравнению с химиопрепаратами, NGF обладает более слабым цитотоксическим *in vitro* действием, которое еще более снижается при их комбинированном применении на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга.

4. В результате анализа механизма синергического действия PG-1 с этопозидом на клетки глиомы U251 показано, что при совместном действии этих соединений *in vitro* наблюдается увеличение гибели клеток по пути апоптоза по сравнению с действием этопозида и PG-1. При действии этопозида отмечается повышение активности каспазы-3, что подтверждает апоптотическую гибель клеток U251. При комбинированном действии NGF с химиопрепаратами отмечается гибель клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы по смешанному типу и некрозу, чем по пути апоптоза при обособленном действии NGF и химиопрепаратов.

5. Обнаружены корреляции между степенью злокачественности пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, эпендимомы, глиобластомы, медуллобластомы, их чувствительностью к химиопрепаратам, NGF и уровнем секреции интерлейкина-6, что позволят в перспективе использовать уровень интерлейкина-6 в качестве диагностического маркера злокачественности и химиорезистентности клеток опухолей мозга.

6. Цитотоксическая активность NGF и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом на клетки анапластической астроцитомы и глиобластомы коррелирует с экспрессией на них TrkA, p75 рецепторов, их соотношения TrkA/p75, показывая, что TrkA/p75 может служить маркером чувствительности клеток анапластической астроцитомы и глиобластомы к NGF и его комбинациям с химиопрепаратами.

7. При *in vitro* применении NGF наблюдается увеличение содержания опухолевых клеток с диплоидным числом копий *MUCN*, *MUSS*-онкогенов и уменьшение доли клеток медуллобластомы с повышенным числом копий обоих онкогенов, обладающих пониженной чувствительностью к NGF, что позволяет рассматривать численность копий *MUSS*-онкогена в качестве маркера резистентности медуллобластомы к NGF и химиотерапии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты о прямом цитотоксическом действии NGF, LL-37 и PG-1 и их комбинаций с химиопрепаратами с синергетическим эффектом на клетки глиом C6, U251, а также NGF и его некоторых комбинаций с химиопрепаратами в отношении клеток ПА, АА, ГБ и МБ пациентов позволяют рассматривать NGF, LL-37 и PG-1 и их комбинации с химиопрепаратами, как прототипы лекарственных препаратов и объекты для доклинических и клинических испытаний.

2. Установленные зависимости между уровнем секреции IL-6 клетками ПА, эпендимомы, АА, ГБ, МБ и степенью злокачественности опухолей их химиорезистентностью при действии химиопрепаратов, NGF, а также экспрессией TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75 на клетках АА, ГБ и чувствительностью к NGF, комбинациям NGF с цисплатином или темозоломидом, отрицательная корреляция между численностью копий *MUSS*-онкогена в клетках МБ и индексом цитотоксичности NGF свидетельствуют о перспективности использования уровня секреции IL-6, численности копий *MUSS*-онкогена и экспрессии TrkA, p75 рецепторов, их соотношения TrkA/p75 в качестве диагностических и прогностических маркеров и мишеней для таргетной терапии опухолей мозга.

3. Разработанный и использованный в работе вариант метода «индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения медуллобластомы, атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли, нейробластомы, астроцитомы, эпендимомы у ребенка», основанный на определении гибели клеток в камере Горяева при окрашивании трипановым

синим ИЦ, позволяет установить и выбрать химиопрепарат или их комбинацию с наибольшим цитотоксическим действием на клетки опухоли у конкретного пациента, а также внести в протоколы химиотерапии соответствующие коррективы.

Полученные сведения могут использоваться в учебном процессе на биологических и медицинских факультетах ВУЗов, а также в клинической практике онкологических стационаров специализированных медицинских учреждений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА	– анапластическая астроцитома
АМП	– антимикробные катионные пептиды
АТФ	– аденозинтрифосфорная кислота
ГБ	– глиобластома
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДМЕМ	– среда Игла в модификации Дульбекко
ИК ₅₀	– индекс концентрации, вызывающий 50 %-ную гибель клеток
ИСД	– индекс снижения дозы
ИЦ	– индекс цитотоксичности
КИ	– комбинационный индекс
МБ	– медуллобластома
МЛУ	– множественная лекарственная устойчивость
ПА	– пилоцитарная астроцитома
РНК	– рибонуклеиновая кислота
Ув.	– увеличение
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
ЦНС	– центральная нервная система
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР	– эндоплазматический ретикулум
ЭТС	– эмбриональная телячья сыворотка
ЯЦС	– ядерно-цитоплазматическое соотношение
С6	– глиома крысы С6
CSP	– цисплатин
EGFR	– рецептор эпидермального фактора роста
i-FISH	– интерфазная флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация
FITC	– флуоресцилизотиоционат
Gr	– степень злокачественности опухоли
IL-6	– интерлейкин-6
JNK	– c-Jun-N-терминальная киназа
LL-37	– кателицидин LL-37

MAPK	– активируемая митогеном протеинкиназа
МТТ	– метилтетразолиевый тест
<i>MYC</i>	– гомолог вирусного <i>v-myc</i> онкогена миелоцитоматоза
<i>MYCN</i>	– аналог <i>MYCV</i> -онкогена вирусного миелоцитоматоза, производимый нейробластомой
NF-κB	– ядерный фактор транскрипции-κB
NGF	– фактор роста нервов
p75	– паннейротрофиновый, низкоаффинный рецептор фактора роста нервов, мозг-производного фактора роста и нейротрофина-3
PG-1	– протегрин-1
PI3K	– фосфатидилинозитол-3-киназный путь
PTEN	– гомолог фосфатазы и тензина
TMZ	– темозоломид
TrkA/p75	– соотношение рецепторов
U251	– клетки глиомы U251 человека

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study / Global Burden of Disease Cancer Collaboration // *JAMA Oncology*. 2017. – V. 3, № 4. – P. 524–548.
2. International agency for research of cancer (Globocan) [Electronic resource] : the World of Health Organization, 2018. – Mode of access: <http://www.globocan.iarc.fr>. – Data of access: 23.10.2020.
3. Clinical, pathological, and molecular characterization of infant medulloblastomas treated with sequential high-dose chemotherapy / L. Lafay-Cousin [et al.] // *Pediatric Blood Cancer*. – 2016. – Vol. 63, № 9. – P. 1527–1534.
4. Survival of children with medulloblastoma in Canada diagnosed between 1990 and 2009 inclusive / D. L. Johnston [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 2015. – Vol. 124, № 2. – P. 247–253.
5. Wen, P.Y. Malignant gliomas in adults/ P. Y. Wen, S. Kesari// *New England J. of Medicine*. – 2008.–Vol. 359, № 5.–P.492–508.
6. Kokunai, T. Differentiation and growth inhibition of glioma cells induced by transfer of *trk A* proto-oncogene / T. Kokunai, H. Iguchi, N. Tamaki // *J. of Neuro-Oncology*. – 1999. – Vol. 42, № 1. – P. 23–34.
7. Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy /F. Safdie [et al.] // *PLoS One*.– 2012.–Vol. 7 : e44603.
8. High-dose methotrexate for pediatric high grade glioma – results of the HIT-GBM-D pilot study / J. E. Wolff [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 2011. – Vol. 102, № 3. – P. 433–442.
9. Radiation plus procarbazine, CCNU, and vincristine in low-grade glioma / J. C. Buckner [et al.] // *New England J. of Medicine*. – 2016. – Vol. 374, № 14. – P. 1344–1355.
10. Randomized phase II adjuvant factorial study of dose-dense temozolomide alone and in combination with isotretinoin, celecoxib, and/or thalidomide for glioblastoma / M. Penas-Prado [et al.] // *Neuro-Oncology*. – 2015. – Vol. 17, № 2. – P. 266–273.
11. Tomlinson, F. H. Comparison of in vitro activity of epipodophyllotoxins with other chemotherapeutic agents in human medulloblastomas / F. H. Tomlinson, M. G. Lihou, P. J. Smith // *Brit. J. of Cancer*. – 1991. – Vol. 64, № 6. – P. 1051–1059.
12. Prolonged Exposure to Doxorubicin in Patients with Glioblastoma Multiforme and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma [Electronic resource]: Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02758>. – Data of access: 23.10.2020.

13. Drug transport across the blood-brain barrier / W. M. Pardridge // *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2012. – Vol. 32, № 11. – P. 1959–1972.
14. Свирновский, А. И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема / А. И. Свирновский // *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. – 2014. – № 4. – С. 15–38.
15. In vitro co-culture model of medulloblastoma and human neural stem cells for drug delivery assessment / D. P. Ivanov [et al.] // *J. of Biotechnology*. – 2015. – Vol. 205. – P. 3–13.
16. Результаты клинического применения методов индивидуальной чувствительности химиотерапевтических препаратов для лечения глиом / Д. Л. Апшкелне [и др.] // *Вопр. Нейрохирург. им. Н.Н. Бурденко*. – 1980. – № 6. – С. 7–12.
17. Medulloblastoma in childhood: revisiting intrathecal therapy in infants and children/ S. Conroy [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 65, № 6. – P. 1173–1189.
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов [и др.] ; под ред.: А. Г. Муляра, О. Н. Чиченкова. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.
19. Guidelines on good pharmacovigilance practices [Electronic resource] : Europ. Medicines Agency, 2015. – Mode of access: <http://www.ema.europa.eu>. – Data of access: 23.10.2020.
20. Селезнева, А. И. Комплексный подход к изучению фармакологических веществ in vitro, ex vivo, in vivo / А. И. Селезнева, А. В. Калатанова, О. В. Афонькина // *Междунар. науч.-исслед. журн.* – 2015. – № 6–2. – С. 125–127.
21. Pimentel, E. Handbook of growth factors : in 3 vol. / E. Pimentel. – London, Tokyo : CRC Press Inc., 1994. – Vol. 2. Chap. 5 : Neurotrophic growth factors. – P. 217–240.
22. Калюнов, В. Н. Биология фактора роста нервной ткани / В. Н. Калюнов. – Минск : Наука и техника, 1986. – 208 с.
23. TrkAIII promotes microtubule nucleation and assembly at the centrosome in SH-SY5Y neuroblastoma cells, contributing to an undifferentiated anaplastic phenotype / A. R. Farina [et al.] // *Biomedical Research Intern.* – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 740187.
24. Vaishnavi, A. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy / A. Vaishnavi, A. T. Le, R. C. Doebele // *Cancer Discovery*. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 25–34.
25. Ectopic expression of TrkA in the adult rat basal ganglia induces both nerve growth factor-dependent and independent neuronal responses / D. Giannakopoulou [et al.] // *J. of Neuroscience Research*. – 2012. – Vol. 90, № 8. – P. 1507–1521.

26. Kraemer, B. R. The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor / B. R. Kraemer, S. O. Yoon, B. D. Carter // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2014. – Vol. 220. – P. 121–164.
27. A model for neuronal competition during development / C. D. Deppmann [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 320. – P. 369–373.
28. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma / A. Tacconelli [et al.] // *Cancer Cell*. – 2004. – Vol. 6, № 4. – P. 347–360.
29. Receptor tyrosine kinase KIT may regulate expression of genes involved in spontaneous regression of neuroblastoma / T. D. Lebedev [et al.] // *Molecular Biology*. (Mosk). – 2015. – Vol. 49, № 6. – P. 1052–1055.
30. The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas / R. Ho [et al.] // *Cancer Letters*. – 2011. – Vol. 305, № 1. – P. 76–85.
31. Association between high levels of expression of the trk gene and favorable outcome of human neuroblastoma/ A. Nakagawara [et al.] // *New England J. of Medicine*. – 1993. – Vol. 328. – P. 847–854.
32. Differential roles of Trk and p75 neurotrophin receptors in tumorigenesis and chemoresistance ex vivo and in vivo / M. Bassili [et al.]// *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2010.–Vol. 65.– P. 1047–1056.
33. Curcumin reduces cisplatin-induced neurotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells / L. M. Mendonça [et al.] // *Neurotoxicology*. – 2013. – Vol. 34. – P. 205–211.
34. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides / X. Zhao [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. e66557.
35. Cationic membrane-active peptides – anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin / N. Do [et al.] // *Experimental Dermatology*. – 2014. – Vol. 23, № 5. – P. 326–331.
36. Pushpanathan, M. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties / M. Pushpanathan, P. Gunasekaran, J. Rajendhran // *Intern. J. of Peptides*. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 675391.
37. Hoskin, D.W. Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides / D.W. Hoskin, A .Ramamoorthy // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 2008. – Vol. 1778. – №. 2. –P. 357–375.
38. Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources (Review) / L. Wang [et al.] // *Oncological Reports*. – 2017. – Vol. 38. – № 2. – P. 637–651.
39. c-MYC expression sensitizes medulloblastoma cells to radio- and chemotherapy and has no impact on response in medulloblastoma patients / A. O. von Bueren [et al.] // *BMC Cancer*. – 2011. – Vol. 11 : 74.

40. Woo, C.W. NGF activation of TrkA decreases N-myc expression via MAPK path leading to a decrease in neuroblastoma cell number / C. W. Woo, E. Lucarelli, C. J. Thiele // *Oncogene*. – 2004. – Vol. 23, № 8. – P. 1522–1530.
41. Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation / H. Q. Yan [et al.] // *Cancer Science*. – 2014. – Vol. 105, № 9. – P. 1220–1227.
42. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells/ Y. Wang [et al.]// *Cancer Letters*. – 2010. – Vol. 295.–P. 110–123.
43. Efficacy of vincristine and etoposide with escalating cyclophosphamide in poor-prognosis pediatric brain tumors/ D. S. Ziegler [et al.] // *Neuro-Oncology*. – 2006.–Vol. 8. – P. 53 –59.
44. Глиальные опухоли головного мозга: современные аспекты классификации и основы генетической предрасположенности / И. И. Ананьева [и др.] // *Архив патол.* – 2007. – № 1. – С. 54–60.
45. Медуллобластомы у детей / А. Е. Соловьёв [и др.] // *Онкопедиатрия*. – 2015. – Т. 2, № 2. – С. 158–161.
46. Медуллобластомы мозжечка у детей (возрастной аспект) / Ю. А. Орлов [и др.] // *Укр. нейрохірург. журн.* – 2015. – №3. – С. 50–53.
47. Childhood medulloblastoma / M. Massimino [et al.] // *Critical Rev. in Oncology/Hematology*. – 2011. – Vol. 79, № 1. – P. 65–83.
48. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus / V. Ramaswamy [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 2016. – Vol. 131, № 6. – P. 821–831.
49. Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma / A. Dréan [et al.] // *Expert Rev Neurotherapy*. – 2016. – Vol. 16, № 11. – P. 1285–1300.
50. In vitro models for the blood-brain barrier / P. Garberg [et al.] // *Toxicology In Vitro*. – 2005. – Vol. 19, № 3. – P. 299–334.
51. Capillary physiology of human medulloblastoma. Impact on chemotherapy / P. C. Warnke [et al.] // *Cancer*. – 2006. – Vol. 107, № 9. – P. 2223–2227.
52. Свирновский, А. И. Молекулярные основы феномена химио- и радиорезистентности при опухолевых процессах / А. И. Свирновский, В. В. Пасюков // *Мед. новости*. – 2007. – № 11. – С. 7–19.
53. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma / A. Alisi [et al.] // *Intern. J. of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol. 14. – P. 24706–24725.
54. Adjuvant chemotherapy in adult medulloblastoma: is it an option for average-risk patients? / E. Franceschi [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 2016. – Vol. 128, № 2. – P. 235–240.

55. Sandberg, A. A. Medulloblastoma, primitive neuroectodermal tumors, and pineal tumors / A. A. Sandberg // *The genetics and molecular biology of neural tumors* / A. A. Sandberg, J. F. Stone. – Totowa, New York : Humana Press, 2008. – Chap. 8. – P. 343–430.
56. Anoop, P. Metatrexate rechallenge following delayed clearance and life-threatening toxicity/ P. Anoop, S. J. Vaidya, J. Mycroft // *Pediatric Hematology and Oncology*. –2008.–Vol. 25.–P. 119–121.
57. Carboplatin and oral cyclophosphamide combination after temozolomide failure in malignant gliomas/ E. Yaman [et al.]// *Tumori*. – 2008.–Vol. 94. –P. 674–680.
58. Neurobiological mechanisms of chemotherapy-induced cognitive impairment in a transgenic model of breast cancer / G. Winocur [et al.] // *Neuroscience*. – 2018. – Vol. 369. – P.51–65.
59. Efficacy of carboplatin administered concomitantly with radiation and isotretinoin as a pro-apoptotic agent in other than average risk medulloblastoma/PNET patients a group wide phase III study / J. M. Olson [et al.] ; eds.: J. M. Olson .– WA (USA) : Children’s Oncology Group ACNS0332 CureSearch, Seattle Children’s Hospital, Seattle, 2010. – 117 p.
60. Outcome of children less than three years old at diagnosis with non-metastatic medulloblastoma treated with chemotherapy on the «Head Start» I and II protocols / G. Dhall [et al.] // *Pediatric Blood and Cancer*. – 2008. – Vol. 50, № 6. – P. 1169–1175.
61. Treatment of adult nonmetastatic medulloblastoma patients according to the paediatric HIT 2000 protocol: a prospective observational multicentre study / C. Friedrich [et al.] // *Europ. J. of Cancer*. – 2012. – Vol. 49, № 12. – P. 893–903.
62. Intensive induction chemotherapy followed by myeloablative chemotherapy with autologous hematopoietic progenitor cell rescue for young children newly-diagnosed with central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors: the Head Start III experience / W. Zaky [et al.] // *Pediatric Blood and Cancer*. – 2014. – Vol. 61, № 1. – P. 95–101.
63. Platinum distribution in malignant glioma following intraoperative intravenous infusion of carboplatin / I. R. Whittle [et al.] // *Brit. J. of Neurosurgery*. – 1999. – Vol. 13, № 2. – P. 132–137.
64. Intrathecal chemotherapy for refractory disseminated medulloblastoma/ J. Yoshimura [et al.]// *Child's Nervous System*. – 2008. – Vol. 24, № 5.–P. 581–585.
65. Huynh, G. H. Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors/ G. H. Huynh, D. F. Deen, F. C. Jr. Szoka // *J. of Controlled Release*. – 2006. – Vol. 110. – P. 236 – 259.
66. Time perception in children treated for a cerebellar medulloblastoma/ S. Droit-Volet [et al.] // *Research in Developmental Disabilities*. – 2013. – Vol. 34, № 1. – P. 480–494.

67. Concurrent intrathecal methotrexate and liposomal cytarabine for leptomeningeal metastasis from solid tumors: a retrospective cohort study / B. J. Scott [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 2014. – Vol. 119, № 2. – P. 361-368.
68. Erratum. Bevacizumab and irinotecan therapy in glioblastoma multiforme: a series of 13 cases / G. Shasby // *J. of Neurosurgery*. – 2018. – Vol. 128, № 4. – P. 1259.
69. Procarbazine, lomustine and vincristine for recurrent high-grade glioma / S. Parasramka [et al.] // *The Cochrane Database of Systematic Rev.* – 2017. – Vol. 7 : CD011773.
70. A phase I study of concurrent RMP-7 and carboplatin with radiation therapy for children with newly diagnosed brainstem gliomas / R. J. Packer [et al.] // *Cancer*. – 2005. – Vol. 104, № 9. – P. 1968–1974.
71. Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood–brain barrier to treat glioblastoma / R. K. Oberoi [et al.] // *Neuro-Oncology*. – 2016. – Vol. 18, № 1. – P. 27–36.
72. Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? – New insights from a rat model / S. Schreiber [et al.] // *Experimental and Translational Stroke Medicine*. – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 4.
73. Death receptor expression and function at the human blood brain barrier//K. Wosik [et al.] // *J. of the Neurological Sciences*. – 2007. – Vol. 259. – P. 53–60.
74. Juillerat–Jeanneret, L. The targeted delivery of cancer drugs across the blood brain barrier: chemical modifications of drugs or drug nanoparticules? / L. Juillerat–Jeanneret // *Drug Discovery Today*. – 2008. – Vol. 13, № 23–24. – P. 1099–1106.
75. Deeken, J. F. The blood—brain barrier and cancer transporters, treatment, and Trojan horses / J. F. Deeken, W. Löscher // *Clinical Cancer Research*. – 2007. – Vol. 13. – P. 1663–1674.
76. Wu, D. Blood–brain barrier transport of reduced folic acid/ D. Wu, W. M. Pardridge// *Pharmacological Research*. – 1999. – Vol. 16. – P. 415–419.
77. A novel human multidrug resistance gene *MDR1* variant *G571A* (G191R) modulates cancer drug resistance and efflux transport/ Z. Yang [et al.] // *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*: – 2008. – Vol. 327, № 2. – P. 474–481.
78. Seigers, R. Neurobiological basis of chemotherapy–induced cognitive impairment: A review of rodent research / R. Seigers, J. E. Fardell // *Neuroscience & Biobehavioral Rev.* – 2011. – Vol. 35. – P. 729–741.
79. Modulation of the blood–brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? / E. M. Kemper [et al.]// *Cancer Treatment Rev.* – 2004. – Vol. 30.–P. 415–423.

80. Cardoso, F. L. Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches/ F. L. Cardoso, D. Brites, M. A. Brito // *Brain Research Rev.* – 2010. – Vol. 64, № 2. – P. 328–363.
81. Ballabh, P. The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications/ P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard// *Neurobiology of. Disease.* – 2004. – Vol. 16. – P. 1–13.
82. Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes / J. Q. Gao [et al.] // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34, № 22. – P. 5628–5639.
83. Synergistic combination of doxorubicin and paclitaxel delivered by blood brain barrier and glioma cells dual targeting liposomes for chemotherapy of brain glioma / X. Chen [et al.] // *Current Pharmacological Biotechnology.* – 2016. – Vol. 17, № 7. – P. 636–650.
84. Fourth generation phosphorus-containing dendrimers : prospective drug and gene delivery carrier / D. Shcharbin [et al.] // *Pharmaceutics.* – 2011. – Vol. 3, № 3. – P. 458–473.
85. Syntheses of water–soluble [60]fullerene derivatives and their enhancing effect on neurite outgrowth in NGF–treated PC12 cells / H. Tsumoto [et al.] // *Bioorganic & Med. Chemistry Letters.* – 2010. – Vol. 20. – P. 1948–1952.
86. Boushehri, Sh. M. A. Nanoparticles as drug carriers: current issues with in vitro testing / Sh. M. A. Boushehri, A. Lamprecht // *Nanomedicine (Lond).* – 2015. – Vol. 10, № 21. – P. 3213–3230.
87. Chitosan nanoparticles for nuclear targeting: the effect of nanoparticle size and nuclear localization sequence density / S. N. Tammam [et al.] // *Molecular Pharmaceutics.* – 2015. – Vol. 12, № 12. – P. 4277–4289.
88. Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier / X. Li [et al.] // *J. of Drug Targeting.* – 2017. – Vol. 25, № 1. – P. 17–28.
89. Active targeting of brain tumors using nanocarriers/ A. Beduneau [et al.]// *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28. – P. 4947–4967.
90. Superparamagnetic iron oxide nanoparticals (SPIONs): development, surface modification and application in chemotherapy/ M. Mahmoudi [et al.] // *Advanced Drug Delivery Rev.* – 2011. – Vol. 63, № 1–2. – P. 24–46.
91. The in vitro and in vivo anti-tumor effects of MTX-Fe₃O₄-PLLA-PEG-PLLA microspheres prepared by suspension-enhanced dispersion by supercritical CO₂ / C. Ai Zheng [et al.] // *Life Sciences.* – 2014. – Vol. 57, № 7. – P. 698–709.
92. Strategy for effective brain drug delivery / M. I. Alam [et al.] // *Europ. J. of Pharmaceutical Sciences.* – 2010. – Vol. 40. – P. 385–403.
93. Онколитические вирусы в терапии глиом / Н. В. Губанова [и др.] // *Молекулярная биол.* – 2012. – Т. 46, № 6. – С. 874–886.

94. Онколитические вирусы в терапии глиом : учеб. пособие / М. В. Тарасова [и др.] ; Новосиби. гос. ун-т. – Новосибирск : РИЦ НГУ, 2015. – 27 с.
95. Martínez-Serrano, A. Protection of the Neostriatum against Excitotoxic Damage by Neurotrophin-Producing, Genetically Modified Neural Stem Cells / A. Martínez-Serrano, A. Björklund // *J of Neuroscience*. – 1996. – Vol. 16, № 15. – P. 4604–4616.
96. Neuroimmune crosstalk in CNS disorders: the histamine connection / R. Cacabelos [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. – 2016. – Vol. 22, № 7. – P. 819–848.
97. Folkman, J. Angiogenesis in cancer therapy – endostatin and its mechanisms of action / J. Folkman // *Experimental Cell Research*. – 2006. – Vol. 312, № 5. – P. 594–607.
98. Anti-angiogenic therapy in pediatric brain tumors: An effective strategy? / M. Sie [et al.] // *Critical Rev. in Oncology/Hematology*. – 2014. – Vol. 89. – P. 418–432.
99. The anti-angiogenic role of soluble-form VEGF receptor in malignant gliomas. S. Takano [et al.] // *Intern. J. of Oncology*. – 2017. – Vol. 50, № 2. – P. 515–524.
100. Lee, P. X. Potential of pigment epithelium-derived factor (PEDF) as a bone regenerative biopharmaceutical / P. X. Lee, C. R. Dass // *Pharmazie*. – 2016. – Vol. 71, № 4. – P. 171–174.
101. Bevacizumab and temozolomide in patients with first recurrence of WHO grade II and III glioma, without 1p/19q co-deletion (TAVAREC): a randomised controlled phase 2 EORTC trial / M. J. van den Bent [et al.] // *Lancet Oncology*. – 2018. – Vol. 19, № 9. – P. 1170–1179.
102. Dramatic response to temozolomide, irinotecan, and bevacizumab for recurrent medulloblastoma with widespread osseous metastases / P. A. Bonney [et al.] // *J. of Clinical Neurosciences*. – 2016. – Vol. 26. – P. 161–163.
103. Abouantoun, T. J. Sunitinib induces PTEN expression and inhibits PDGFR signaling and migration of medulloblastoma cells/ TJ. Abouantoun, R.C. Castellino, T.J. MacDonald // *J. of Neuro-Oncology*. – 2011. – Vol. 101, № 2. – P. 215–226.
104. Preclinical testing of tandutinib in a transgenic medulloblastoma mouse model / S. Ohshima–Hosoyama [et al.] // *J. of Pediatric Hematology/Oncology*. – 2012. – Vol. 34, № 2. – P. 116–121.
105. Reported outcomes of children with newly diagnosed high-grade gliomas treated with nimotuzumab and irinotecan / N. Sirachainan [et al.] // *Child's Nervous System*. – 2017. – Vol. 33, № 6. – P. 893–897.
106. Critical role of STAT3 in IL-6-mediated drug resistance in human neuroblastoma / T. Ara [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, № 13. – P. 3852–3864.
107. Sonic hedgehog medulloblastoma cancer stem cells mirnome and transcriptome highlight novel functional networks / A. Po [et al.] // *The Intern. J. of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 8: 2326.

108. Alexandrova, E. M. P73 is dispensable for commitment to neural stem cell fate, but is essential for neural stem cell maintenance and for blocking premature differentiation / E. M. Alexandrova, F. Talos, U. M. Moll // *Cell Death and Differentiation*. – 2013. – Vol. 20, № 2. – P. 368.
109. A comprehensive approach to patient-individual glioblastoma multiforme model establishment / C. S. Mullins [et al.] // *J. of Cancer Science of Therapy*. – 2014. – V. 6. – P. 177–187.
110. Корреляция между чувствительностью к химиотерапевтическим препаратам опухолевых лимфоидных клеток *in vitro* / А. И. Свирновский [и др.] // *Гематология и трансфузиология*. – 2007. – Т. 52, № 5. – С. 26–31.
111. Разработка принципов создания диагностического набора для оценки лекарственной чувствительности лейкозных клеток / А. И. Свирновский [и др.] // *Пробл. здоровья и экол.* – 2011. – № 3. – С. 94–100.
112. Strickland, S. A. Correlation of the microculture-kinetic drug-induced apoptosis assay with patient outcomes in initial treatment of adult acute myelocytic leukemia / S. A. Strickland, A. Raptis, A. Hallquist // *Leukemia and Lymphoma*. – 2013. – Vol. 54, № 3. – P. 528–534.
113. Химиотерапия злокачественных новообразований / В. Де Вита-младший [и др.] ; под ред.: Э. Чу, В. Де Виты-младшего. – М. : Практика, 2008. – 447 с.
114. Шелег, С.В. Апоптоз и проблема лекарственной резистивности опухолевых клеток / С.В. Шелег, А.И. Свирновский // *Мед. новости*. – 1999. – № 10. – С. 10–15.
115. Свирновский, А.И. Плейотропная резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям при В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях / А. И. Свирновский, С. А. Григорович // *Мед. новости*. – 2005. – № 9. – С. 5–16.
116. Иншаков, А. Н. Фармакодинамическое моделирование чувствительности опухолевых клеток хронического лимфолейкоза и множественной миеломы к химиопрепаратам *in vitro* : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.12 / А. Н. Иншаков ; Рос. онкол. науч. центр им. Н. Н. Блохина РАМН. – М., 2012. – 26 с.
117. Скрининг лекарственной чувствительности лейкозных клеток как вариант персонализации терапии опухолевых заболеваний лимфоидной ткани / А. И. Свирновский [и др.] // *Здравоохранение*. – 2012. – № 7. – С. 8–13.
118. Свирновский, А. И. Персонализация терапии лейкозов : роль некоторых лабораторных технологий / А. И. Свирновский // *Мед. новости*. – 2013. – № 9. – С. 6–11.
119. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd ed.) / D. J. Klionsky [et al.] // *Autophagy*. – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 1–222.
120. Kimmel, D. W. *In vitro* drug sensitivity testing in human gliomas / D. W. Kimmel, J. R. Shapiro, W. R. Shapiro // *J. of Neurosurgery*. – 1987. – Vol. 66, № 2. – P. 161–171.

121. Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a metaanalysis / J. E. Wolff [et al.] // *J. of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 1999. – Vol. 125, № 8/9. – P. 481–486.
122. Antiproliferative effect of novel platinum(II) and palladium(II) complexes on hepatic tumor stem cells in vitro / N. Miklášová [et al.] // *Europ. J. of Med. Chemistry*. – 2012. – Vol. 49. – P. 41–47.
123. Extreme drug resistance assay results do not influence survival in women with epithelial ovarian cancer / A. K. Karam [et al.] // *Gynecological Oncology*. – 2009. – Vol. 114, № 2. – P. 246–252.
124. Chemosensitivity testing of human gliomas using a fluorescent microcarrier technique / A. P. Jr. Bowles [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 1990. – Vol. 8, № 2. – P. 103–112.
125. Comparison of in vitro cloning assays for drug sensitivity testing of human brain tumours / M. E. Berens [et al.] // *Brit. J. of Neurosurgery*. – 1988. – Vol. 2, № 2. – P. 227–234.
126. Histoculture drug response assay in colorectal cancer / B. Nemekhbayar [et al.] // *Value Health*. – 2014. – Vol. 17, № 7. – P. A726.
127. In vitro chemosensitivity using the histoculture drug response assay in human epithelial ovarian cancer / S. W. Lee [et al.] // *Acta Medica Okayama*. – 2012. – Vol. 66, № 3. – P. 271–277.
128. Emetine induces chemosensitivity and reduces clonogenicity of acute myeloid leukemia cells / J. M. Cornet-Masana [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 17. – P. 23239–23250.
129. Utilization of the soft agar colony formation assay to identify inhibitors of tumorigenicity in breast cancer cells / S. Horibata [et al.] // *J. of Visualized Experiments*. – 2015. – Vol. 99: e52727.
130. Weisenthal, L. M. Differential staining cytotoxicity assay: a review / L. M. Weisenthal // *Methods in Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 731. – P. 259–283.
131. The AutoDiSC: development and validation of a novel chemotherapy sensitivity and resistance assay / T. Schinköthe [et al.] // *Anticancer Research*. – 2013. – Vol. 33, № 6. – P. 2491–2498.
132. In vitro chemoresistance and chemosensitivity assays : medical policy # : 097; Blue Cross and Blue Shield of Alabama, Latest Review Date: April 2014. – 19p. [Electronic resource] : Mode of access: https://www.supercoder.com/webroot/upload/general_pages_docs/document/097.pdf. – Data of access: 17.10.2020.
133. Тканевая инженерия опухолей с использованием биореакторных технологий / А. Е. Гуллер [и др.] // *Acta Naturae*. – 2016. – Т. 8, № 3. – С. 49–65.
134. The microculture-kinetic (MiCK) assay : the role of a drug-induced apoptosis assay in drug development and clinical care / L. Bosserman [et al.] // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72, № 16. – P. 3901–3905.
135. Flow cytometric chemosensitivity assay using JC-1, a sensor of mitochondrial transmembrane potential, in acute leukemia / T. Yokosuka [et al.] // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2013. – Vol. 72, № 6. – P. 1335–1342.

136. Differences in chemosensitivity between primary and paired metastatic lung cancer tissues: in vitro analysis based on the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST) // M. Higashiyama [et al.] // *J. of Thoracic Disease*. – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 40–47.
137. DIMSCAN: a microcomputer fluorescence-based cytotoxicity assay for preclinical testing of combination chemotherapy / N. Keshelava [et al.] // *Methods in Molecular Medicine*. – 2005. – Vol. 110. – P. 139–153.
138. Активність ацетилхолінэстеразы в опухолевых клетках железистого эпителия при раке молочной железы / Н. А. Шуканова [и др.] // *Весті Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук*. – 2013. – № 3. – С. 28–31.
139. Use of ChemoFx for identification of effective treatments in epithelial ovarian cancer / S. Richard [et al.] // *PLoS Current*. – 2015. – Vol. 7. (
140. 3-Methyladenine induces cell death and its interaction with chemotherapeutic drugs is independent of autophagy / Y. Sheng [et al.] // *Biochem. and Biophys. Research Communications*. – 2013. – Vol. 432, № 1. – P. 5–9.
141. Ставровская, А. А. Проблемы устойчивости глиобластом к лекарственной терапии / А. А. Ставровская, С. С. Шушанов, Е.Ю. Рыбалкина // *Биохимия*. – 2016. – Т. 81, № 2. – С. 179–190.
142. Свирновский, А. И. Методологически исследования лекарственной чувствительности лейкозных клеток / А. И. Свирновский // *Пробл. здоровья и экол.* – 2011. – № 3. – С. 89–91.
143. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry / B. A. Avelar-Freitas [et al.] // *Brazil. J. of Med. and Biol. Research* – 2014. – Vol. 47, № 4. – P. 307–315.
144. Cohen, S. Levi-Montalcini, R. A nerve growth–stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180 / S. Cohen, R. Levi-Montalcini, V. Hamburger // *Proc. Natl. Acad. Sciences. of USA*. – 1954. – Vol. 40, № 10. – P. 1014–1018.
145. Nerve growth factor: Structure/function relationships / R. A. Bradshaw [et al.] // *Protein Science*. – 1994. – Vol. 3. – P. 1901–1913.
146. Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor: thirty-five years later / R. Levi-Montalcini // *The EMBO J.* – 1987. – Vol. 6, № 5. – P. 1146–1154.
147. Nerve Growth Factor Pathobiology During the Progression of Alzheimer’s Disease / E. J. Mufson [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13 : 533.
148. Исаев, Н.К. Роль фактора роста нервов в пластических перестройках холинэргических нейронов базальных ядер переднего мозга / Н.К. Исаев, Е.В. Стельмашук, Е.Е. Генрихс // *Биохимия*. – 2017. – Т. 82, Вып. 3. – С. 429 – 440.

149. Nerve Growth Factor Levels are Associated with Overactive Bladder Symptoms and Long-Term Treatment Outcome after Transurethral Resection of the Prostate in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia / H Hu [et al.] // *J. of Urology*. – 2018. – Vol. 200, № 3. – P. 620-625.
150. Nerve growth factor promotes gastric tumorigenesis through aberrant cholinergic signaling / Y. Hayakawa [et al.] // *Cancer Cell*. – 2017. – Vol. 31, № 1. – P. 21–34.
151. Oakley, F. Hepatocytes Express Nerve Growth Factor during Liver Injury. Evidence for Paracrine Regulation of Hepatic Stellate Cell Apoptosis / F. Oakley, N. Trim, C M. Constandinou // *Amer. J. of Pathology*. – 2003. – Vol. 163, № 5. – P. 1849–1858.
152. Localization of the low-affinity nerve growth factor receptor p75 in human limbal epithelial cells / N. Di Girolamo [et al.] // *J. of Cell and Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 12, № 6b. – P. 2799–2811.
153. Nerve Growth Factor Induces Proliferation and Aggressiveness in Prostate Cancer Cells / M Di Donato [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11, № 6: 784.
154. NGF from pancreatic stellate cells induces pancreatic cancer proliferation and invasion by PI3K/AKT/GSK signal pathway / J. Jiang [et al.] // *J. of Cellular and Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 24, № 10. – P. 5901-5910.
155. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells / L. Dollé [et al.] // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22, № 36. – P. 5592-601.
156. Expression of nerve growth factor in rat stomach. Implications for interactions between endothelial, neural and epithelial cells / A. S. Tarnawski [et al.] // *J of Physiology and Pharmacology*. – 2016. – Vol. 67, № 6. – P. 879-883.
157. The Precursor for Nerve Growth Factor (proNGF) in Thyroid Cancer Lymph Node Metastases: Correlation with Primary Tumour and Pathological Variables / C W. Rowe [et al.] // *Intern. J of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 23: 5924.
158. Regulation of nerve growth factor and nerve growth factor receptor production by NMDA in C6 glioma cells / T. Amano [et al.] // *Molecular Brain Research*. – 1992. – Vol. 14. – P. 35-42.
159. Sonnenfeld, K. H. Nerve growth factor effects and receptors in cultured human neuroblastoma cell lines / K. H. Sonnenfeld, D. N. Ishii // *J. of Neuroscience Research*. – 1982. – Vol. 8, № 2-3. – P. 375-391.
160. Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting Gβγ-microtubule interaction / J. A. Sierra-Fonseca [et al.] // *BMC Neuroscience*. – 2014. – Vol. 15, Article number: 132.

161. Pro-nerve Growth Factor Induces Autocrine Stimulation of Breast Cancer Cell Invasion through Tropomyosin-related Kinase A (TrkA) and Sortilin Protein / Y. Demont [et al.] // *J. of Biol. Chemistry.* – 2012. – Vol. 287, № 3. – P. 1923–1931.
162. Nerve growth factor and its receptors on onset and diagnosis of ovarian cancer / X. Yu [et al.] // *Oncological Letters.* – 2017. – Vol. 14, № 3. – P. 2864–2868.
163. Paul, A. B. The expression and localisation of beta-nerve growth factor (beta-NGF) in benign and malignant human prostate tissue: relationship to neuroendocrine differentiation / A. B. Paul, E. S. Grant, F. K. Habib // *Brit. J of Cancer.* – 1996. – Vol. 74, № 12. – P. 1990–1996.
164. Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells / C. Li [et al.] // *J. Neurochemistry.* – 2010. – Vol. 112, № 4. – P. 882–899.
165. Nerve growth factor activates autophagy in Schwann cells to enhance myelin debris clearance and to expedite nerve regeneration / R. Li [et al.] // *Theranostics.* – 2020. – Vol. 10, № 4. – P. 1649–1677.
166. The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 and Mimics are Potential Anticancer Drugs / K. Kuroda [et al.] // *Frontiers of Oncology.* – 2015. – Vol. 5. – P 144.
167. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3 / O.E. Sørensen [et al.] // *Blood.* – 2001. – Vol. 97, № 12. – P. 3951–3959.
168. Henzler-Wildman, K. A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37 / K.A. Henzler-Wildman, D.K. Lee, A. Ramamoorthy // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – P. 6545–6558.
169. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-selective activity / Z. Oren [et al.] // *Biochem. J.* – 1999. – Vol. 341. – P. 501–513.
170. Nguyen, L. T. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action / L. T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel // *Trends in Biotechnology.* – 2011. – Vol. 29, №9. – P.464–72.
171. Review on Bioactive Porcine Peptide, Protegrin-1 / S. Sunil [et al.] // *Intern. J. of Peptide Research and Therapeutics.* – 2020. – Vol. 26. – P. 1493–1501.
172. Protegrin-1 cytotoxicity towards mammalian cells positively correlates with the magnitude of conformational changes of the unfolded form upon cell interaction / N. Soundrarajan [et al.] // *Sci. Reports.* – 2019. – Vol. 9, Article number: 11569.

173. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils / O. Sørensen [et al.] // *Blood*. – 1997. – Vol. 90. – P. 2796–2803.
174. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and co-localizes with interleukin-6 / M. F. Nilsson [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1999. – Vol. 67. – P. 2561–2566.
175. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface / R. Bals [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sciences of USA*. – 1998. – Vol. 95. – P. 9541–9546.
176. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations / B. Agerberth [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – P. 3086–3093.
177. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders / M. Frohm [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – P. 15258–15263.
178. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide / D. Vandamme [et al.] // *Cellular Immunology*. – 2012. – Vol. 280. – P. 22–35.
179. Молекулярные механизмы противоопухолевого действия природных антимикробных пептидов / С.В. Баландин [и др.] // *Биоорганическая химия*. – 2016. – Т. 42, № 6. – С. 633–648.
180. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37 / J. Johansson [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – P. 3718–3722.
181. Roles and Mechanisms of Human Cathelicidin LL-37 in Cancer / X. Chen [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 47, № 3. – P. 1060–1073.
182. Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure / R. Shaykhiev [et al.] // *Amer. J. of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2005. – Vol. 289. – P. L842–L848.
183. Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials / R M. van Harten [et al.] // *Vaccines*. – 2018. – Vol. 6: 63.
184. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре / О. В. Шамова [и др.] // *Цитология*. – 2007. – Т. 49, № 12. – С. 1000–1010.
185. Emerging roles of the host defense peptide LL-37 in human cancer and its potential therapeutic applications / W. K. Wu [et al.] // *J. Intern. of Cancer*. – 2010. – Vol. 127. – P. 1741–1747.

- 186.LL-37 as a therapeutic target for late stage prostate cancer / J. A. Hensel [et al.] // *Prostate*. – 2011. – Vol. 71. – P. 659–670.
- 187.C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells / K. Okumura [et al.] // *Cancer Letters*. – 2004. – Vol. 212. – P. 185–194.
- 188.The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development / E. Piktel [et al.] // *Arch. Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*. – 2016. – Vol. 64. – P. 33–46.
- 189.Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis / L. Ouyang [et al.] // *Cell Proliferation*. – 2012. – Vol. 45. – P. 487–498.
- 190.Deslouches, B. Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications / B. Deslouches, P.Y. Di // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 46635–46651.
- 191.Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics-A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? / M.S. Zharkova [et al.] // *Front and Infection Microbiology*. – 2019. – Vol. 9: 128.
- 192.Zwaal, R. F. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells / R.F. Zwaal, P. Comfurius, E.M. Bevers // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2005. – Vol. 62, № 9. – P. 971–988.
- 193.Iozzo R. V. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis / R.V. Iozzo, R. D. Sanderson // *J. of Cellular and Molecular Medicine*. – 2011. – Vol. 15, № 5. – P. 1013–1031.
- 194.Dube, D. H. Glycans in Cancer and Inflammation--Potential for Therapeutics and Diagnostics / D. H. Dube, C. R. Bertozzi // *Nat. Rev. Drug Discovery*. – 2005. – Vol. 4, № 6. – P. 477–488.
- 195.Strandberg, E. AMPs and OMPs: Is the folding and bilayer insertion of β -stranded outer membrane proteins governed by the same biophysical principles as for α -helical antimicrobial peptides? / E. Strandberg, A.S. Ulrich // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 2015. – Vol. 1848, № 9. – P.1944–1954.
- 196.Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation / R. A. Cruciani [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sciences of USA*. – 1991. – Vol. 88, № 9. – P. 3792–3796.
- 197.Riedl, S. Membrane-active host defense peptides – challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs / S. Riedl, D. Zweytick, K. Lohner // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2011. – Vol. 164, № 8. – P. 766–781.

198. Simons, K. How cells handle cholesterol / K. Simons, E. Ikonen // *Science*. – 2000. – Vol. 290. – P. 1721–1726.
199. Interaction and Cellular Localization of the Human Host Defense Peptide LL-37 with Lung Epithelial Cells / Y.E. Lau [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 1. – P. 583–591.
200. Molecular mechanisms of LL-37-induced receptor activation: An overview / E. T. Verjans [et al.] // *Peptides*. – 2016. – Vol. 85. – P. 16–26.
201. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release / D. Ferrari [et al.] // *The J. of Immunology*. – 2006. – Vol. 176. – P. 3877–3883.
202. Involvement of P2X(7) purinergic receptor and MEK1/2 in interleukin-8 up-regulation by LL-37 in human gingival fibroblasts / P. Montreekachon [et al.] // *J. of Periodontal Research*. – 2011. – Vol. 46. – P. 327–337.
203. Association between interleukin-8-251A/T polymorphism and risk of lung cancer: a meta-analysis / P. Gao [et al.] // *Cancer Investigation*. – 2014. – Vol. 32. – P. 518–525.
204. The human cathelicidin LL-37– A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator / D. Xhindoli [et al.] // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 2016. – Vol. 1858, № 3. – P. 546–566.
205. Identification of the cathelicidin peptide LL-37 as agonist for the type I insulin-like growth factor receptor. A. Girnita [et al.] // *Oncogene*. – 2012. – V. 31. – P. 352–365.
206. The Antimicrobial Peptide LL-37 Activates Innate Immunity at the Airway Epithelial Surface by Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor / G. Tjabringa [et al.] // *The J. of Immunology*. – 2003. – Vol. 171, № 12. – P. 6690–6696.
207. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth / H. M. Khandwala [et al.] // *Endocrinological Rev.* – 2000. – Vol. 21. – P. 215–244.
208. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis / S. Sandgren [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 17. – P. 17951–17956.
209. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide / R. Lande [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 449. – P. 564–569.
210. Leifer, C. A. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling / C.A. Leifer, A. E. Medvedev // *J. of Leukocyte Biology*. – 2016. – Vol. 100. – P. 927–941.
211. Intracellular Receptor for Human Host Defense Peptide LL-37 in Monocytes / N. Mookherjee [et al.] // *The J. of Immunology*. – 2009. – Vol. 183, № 4. – P. 2688–2696.
212. Human cathelicidin peptide LL37 binds telomeric G-quadruplex / J. Jana [et al.] // *Molecular BioSystems*. – 2013. – Vol. 9. – P. 1833–1836.

213. In Vitro Characterization of Novel Protegrin-1 Analogues Against Neoplastic Cells / H.A. Rothan [et al.] // *Intern. J. of Peptide Research and Therapeutics*. – 2014. – V. 20, № 3, – P. 259-267.
214. Exposure to the antimicrobial peptide LL-37 produces dendritic cells optimized for immunotherapy / E. G. Findlay [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2019. – Vol. 8, № 8: 1608106. (
215. Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulfide bridges for pore formation / M. E. Mangoni [et al.] // *FEBS Letters*. – 1996. – Vol. 383. – P. 93–98.
216. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides / G. Drin [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 33. – P. 31192-31201.
217. Penney, J. Protegrin 1 Enhances Innate Cellular Defense via the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Pathway / J. Penney, J. Li // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2018. – Vol. 8: 331.
218. Insertion selectivity of antimicrobial peptide protegrin-1 into lipid monolayers: effect of head group electrostatics and tail group packing / Y. Ishitsuka [et al.] // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 2006. – Vol. 1758. №. 9. P. 1450-1460.
219. 5-Fluorouracil signaling through a calcium–calmodulin-dependent pathway is required for p53 activation and apoptosis in colon carcinoma cells / G. Can [et al.] // *Oncogene*. – 2013. – Vol. 32, № 38. – P. 4529-4538.
220. Activation of human mast cells by retrocyclin and protegrin highlight their immunomodulatory and antimicrobial properties / K. Gupta [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – P. 28573–28587.
221. Sensing lymphoma cells based on a cell-penetrating/apoptosis-inducing/electron-transfer peptide probe / K. Sugawara [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2016. – Vol. 924. – P. 106–113.
222. Barford, K. The neurotrophin receptor signaling endosome: Where trafficking meets signaling / K. Barford, C. Deppmann, B. Winckler // *Developmental Neurobiology*. – 2017. – Vol. 77, № 4. – P. 405–418.
223. Identification of novel candidate compounds targeting TrkB to induce apoptosis in neuroblastoma / Y. Nakamura [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2014. – Vol. 3, № 1. – P. 25–35.
224. Response of medulloblastoma cells to vincristine and lomustine: role of TRKC, CTNNB1 and STK15 / Z. Shinwari [et al.] // *Anticancer Research*. – 2011. – Vol. 31, № 5. – P. 1721–1733.
225. Expression patterns of Trk-A, Trk-B, GRP78, and p75NTR in olfactory neuroblastoma / I. Weinreb [et al.] // *Human Pathology*. – 2009. – Vol. 40, № 9. – P. 1330–1335.
226. Mechanism for the induction of cell death in ONS-76 medulloblastoma cells by Zhangfei/CREB-ZF / T. W. Bodnarchuk [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 2012. – Vol. 109, № 3. – P. 485–501.
227. Rosenthal, A. Modulation of neurotrophin signaling by monoclonal antibodies / A. Rosenthal, J. C. Lin // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2014. – Vol. 220. – P. 497–512.

228. Tumor suppressor proteins are differentially affected in human ependyoblastoma and medulloblastoma cells exposed to nerve growth factor / A. Antonelli [et al.] // *Cancer Investigation*. – 2007. – Vol. 25, № 2. – P. 94–101.
229. Exon-level expression analyses identify mycn and NTrk1 as major determinants of alternative exon usage and robustly predict primary neuroblastoma outcome / A. Schramm [et al.] // *Brit. J. of Cancer*. – 2012. – Vol. 107, № 8. – P. 1409–1417.
230. Death domain signaling by disulfide-linked dimers of the p75 neurotrophin receptor mediates neuronal death in the CNS / K. Tanaka [et al.] // *J. of Neuroscience*. – 2016. – Vol. 36, № 20. – P. 5587–5595.
231. Neuroblastoma in dialog with its stroma: NTRK1 is a regulator of cellular cross-talk with Schwann cells / K. W. Pajtler [et al.] // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5, № 22. – P. 11180–11192.
232. Neurotrophin receptors and heparanase: a functional axis in human medulloblastoma invasion / D. Marchetti [et al.] // *J. of Experimental Clinical Cancer Research*. – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 5–23.
233. Mok, S. A. A retrograde apoptotic signal originating in NGF-deprived distal axons of rat sympathetic neurons in compartmented cultures / S. A. Mok, K. Lund, R. B. Campenot // *Cell Research*. – 2009. – Vol. 19, № 5. – P. 546–560.
234. Mammalian target of rapamycin inhibitors, temsirolimus and torin 1, attenuate stemness-associated properties and expression of mesenchymal markers promoted by phorbol-myristate-acetate and oncostatin-M in glioblastoma cells / G. Chandrika [et al.] // *Tumour Biology*. – 2017. – Vol. 39, № 3. – Article ID 10428317695921.
235. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma / X. Li [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 22. – P. 33440–33450.
236. Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort / S. M. Waszak [et al.] // *Lancet Oncology*. – 2018. – Vol. 19, № 6. – P. 785–798.
237. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: review of smoothed and GLI inhibitors / T. K. Rimkus [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2016. – Vol. 8, № 2. – P. 22.
238. Protein kinase D signaling in cancer: A friend or foe? / A. Roy [et al.] // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 2017. – Vol. 1868, № 1. – P. 283–294.
239. Dicer1 ablation impairs responsiveness of cerebellar granule neuron precursors to sonic hedgehog and disrupts expression of distinct cell cycle regulator genes / Q. Liu [et al.] // *Cerebellum*. – 2017. – Vol. 16, № 2. – P. 450–461.

240. Chou, T. T. p38 mitogen-activated protein kinase-independent induction of gadd45 expression in nerve growth factor-induced apoptosis in medulloblastomas / T. T. Chou, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee // *J. of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276, № 44. – P. 41120–41127.
241. RTOG 0211 : a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients / A. Chakravarti [et al.] // *Intern. J. of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2013. – Vol. 85, № 5. – P. 1206–1211.
242. Targeting inhibitors of apoptosis proteins suppresses medulloblastoma cell proliferation via G2/M phase arrest and attenuated neddylation of p21/ S.-M. Chen [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2018. – Vol. 7. – P. 3988–4003.
243. MicroRNA-21 silencing enhances the cytotoxic effect of the antiangiogenic drug sunitinib in glioblastoma / P. M. Costa [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2013. – Vol. 22, № 5. – P. 904–918.
244. Entrectinib: a potent new TRK, ROS1, and ALK inhibitor / C. Rolfo [et al.] // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 2015. – Vol. 24, № 11. – P. 1493–1500.
245. Resistance to the atypical retinoid ST1926 in SK-N-AS cells selected the subline rAS-ST with enhanced sensitivity to ATRA mediated by not conventional mechanisms: DNA damage, G2 accumulation and late telomerase inhibition / A. M. Di Francesco [et al.] // *Toxicology In Vitro*. – 2015. – Vol. 29, № 7. – P. 1628–1638.
246. Shi, L. All-trans retinoic acid enhances temozolomide-induced autophagy in human glioma cells U251 via targeting Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway / L. Shi, H. Li, Y. Zhan // *Oncological Letters*. – 2017. – Vol. 14, № 3. – P. 2709–2714.
247. Prognostic classification of pediatric medulloblastoma based on chromosome 17p loss, expression of MYCC and MYNC and Wnt pathway activation / A. K. Park [et al.] // *Neuro-Oncology*. – 2012. – Vol. 14, № 2. – P. 203–214.
248. MYC family amplification and clinical risk-factors interact to predict an extremely poor prognosis in childhood medulloblastoma / S. L. Ryan [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 2012. – Vol. 123, № 4. – P. 501–513.
249. Ruiz-Pérez, M. V. The MYCN protein in health and disease / M. V. Ruiz-Pérez, A. B. Henley, M. Arsenian-Henriksson // *Genes (Basel)*. – 2017. – Vol. 8, № 4: 113.
250. Chakrabarti, M. Sequential hTERT knockdown and apigenin treatment inhibited invasion and proliferation and induced apoptosis in human malignant neuroblastoma SK-N-DZ and SK-N-BE2 cells / M. Chakrabarti, N. L. Banik, S. K. Ray // *J. of Molecular Neuroscience*. – 2013. – Vol. 51, № 1. – P. 187–198.

251. Identification of c-myc-dependent proteins in the medulloblastoma cell line D425Med / A. A. Azizi [et al.] // *Amino Acids*. – 2012. – Vol. 42, № 6. – P. 2149–2163.
252. Genetic alterations in microRNAs in medulloblastomas / S. Q. Lv [et al.] // *Brain Pathology*. – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 230–239.
253. BioID identifies novel c-MYC interacting partners in cultured cells and xenograft tumors / D. Dingar [et al.] // *J. of Proteomics*. – 2015. – V. 18. – P. 95–111.
254. Gamma-secretase-independent role for cadherin-11 in neurotrophin receptor p75 (p75(NTR)) mediated glioblastoma cell migration / J. Berghoff [et al.] // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2015. – Vol. 69. – P. 41–53.
255. Glioma invasion mediated by the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)/CD271) requires regulated interaction with PDLIM1 / B. Y. Ahn [et al.] // *Oncogene*. – 2016. – Vol. 35, № 11. – P. 1411–1422.
256. Dynamics of the ternary complex formed by c-Myc interactor JPO2, transcriptional co-activator LEDGF/p75, and chromatin / J. Hendrix [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, № 18. – P. 12494–12506.
257. Functional cross-talk between the cellular prion protein and the neural cell adhesion molecule is critical for neuronal differentiation of neural stem/precursor cells / K. Prodromidou [et al.] // *Stem Cells*. – 2014. – Vol. 32, № 6. – P. 1674–1687.
258. RNA interference-mediated c-MYC inhibition prevents cell growth and decreases sensitivity to radio- and chemotherapy in childhood medulloblastoma cells / A. O. von Bueren [et al.] // *BMC Cancer*. – 2009. – Vol. 9 : 10.
259. Upregulation of IL-11, an IL-6 family cytokine, promotes tumor progression and correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer / M. Zhao [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 45, № 6. – P. 2213–2224.
260. Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer / M. S. Kim [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 37. – P. 40158–40171.
261. NF- κ B-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma / B. C. McFarland [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, №11: e78728.
262. The p38-MK2-HuR pathway potentiates EGFRvIII-IL-1 β -driven IL-6 secretion in glioblastoma cells / F. M. Gurgis [et al.] // *Oncogene*. – 2015. – Vol. 34, № 22. – P. 2934–2942.
263. Psoralen reverses the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human breast cancer MCF-7/ADR cells / J. Jiang [et al.] // *Molecular Medicine and Repair*. – 2016. – Vol. 13, № 6. – P. 4745–4750.

264. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications / L. Manni [et al.] // *Growth Factors*. – 2013. – Vol. 31, № 4. – P. 115–122.
265. Patients treated with antitumor drugs displaying neurological deficits are characterized by a low circulating level of nerve growth factor / S. de Santis [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2000. – Vol. 6, № 1. – P. 90–95.
266. Drug delivery from hydroxyapatite-coated titanium surfaces using biodegradable particle carriers / J. S. Son [et al.] // *J. of Biomedical Materials Research. Pt. B : Appl. Biomaterials*. – 2013. – Vol. 101, № 2. – P. 247–257.
267. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury / G. W. Hawryluk [et al.] // *Stem Cells Development*. – 2012. – Vol. 21, № 12. – P. 2222–2238.
268. Hofsfield, L. A. Intravenous infusion of nerve growth factor-secreting monocytes supports the survival of cholinergic neurons in the nucleus basalis of Meynert in hypercholesterolemia Brown-Norway rats / L. A. Hofsfield, D. Ehrlich, C. Humpel // *J. of Neuroscience Research*. – 2014. – Vol. 92, № 3. – P. 298–306.
269. A phase 1 study of stereotactic gene delivery of AAV2-NGF for Alzheimer's disease / M. S. Rafii [et al.] // *Alzheimers Dementia*. – 2014. – Vol. 10, № 5. – P. 571–581.
270. Belova, E. Insights from mathematical modeling for convection-enhanced intraputamenal delivery of GDNF / E. Belova, C. L. Shaffer, P. E. Trapa // *Medical & Biological Engineering & Computing*. – 2017. – Vol. 55, № 12. – P. 2069–2077.
271. Healy A. T. Convection-enhanced drug delivery for gliomas / A. T. Healy, M. A. Vogelbaum // *Surgical Neurology Intern.* – 2015. – Vol. 6, Suppl. 1. – P. S59–S67.
272. Dictyophorines A and B, two stimulators of NGF synthesis from the mushroom *Dictyophora industriata* / H. Kawagishi [et al.] // *Phytochemistry*. – 1997. – Vol. 45, № 6. – P. 1203–1205.
273. Safety and pharmacokinetics of escalating doses of human recombinant nerve growth factor eye drops in a double-masked, randomized clinical trial / M. P. Ferrari [et al.] // *BioDrugs*. – 2014. – Vol. 28, № 3. – P. 275–283.
274. Intranasal nerve growth factor enhances striatal neurogenesis in adult rats with focal cerebral ischemia / W. Zhu [et al.] // *Drug Delivery*. – 2011. – Vol. 18, № 5. – P. 338–343.
275. Nerve Growth Factor Eye Drops Treatment in Patients With Retinitis Pigmentosa and Cystoid Macular Edema (NEMO) [Electronic resource] : *Clinical Trials*. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02609165?cond=NGF&draw=5&rank=34> – Data of access: 23.10.2020.

276. An 8-week Study to Evaluate Safety and Efficacy of NGF Eye Drops Solution Versus Vehicle in Patients With Dry Eye [Electronic resource] : Clinical Trials. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03019627?cond=NGF&draw=7&rank=54> – Data of access: 23.10.2020.
277. Nerve growth factor expression correlates with severity and outcome of traumatic brain injury in children / A. Chiaretti [et al.] // *Europ. J. of Paediatric Neurology*. – 2008. – Vol. 12, № 3. – P. 195-204.
278. Effects of Intranasal Nerve Growth Factor for Traumatic Brain Injury [Electronic resource] : Clinical Trials. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01212679?cond=NGF&draw=4&rank=28>. – Data of access : 23.10.2020.
279. Nerve Growth Factor Levels are Associated with Overactive Bladder Symptoms and Long-Term Treatment Outcome after Transurethral Resection of the Prostate in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia / H Hu [et al.] // *J. of Urology*. – 2018. – Vol. 200, № 3. – P. 620-625.
280. Prognostic Value of the Urinary Nerve Growth Factor in the Patients With Benign Prostatic Hyperplasia [Electronic resource] : Clinical Trials. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01781117?cond=NGF&draw=2&rank=9>. – Data of access: 23.10.2020.
281. Treatment of Cerebral Radiation Necrosis (CRN) With Nerve Growth Factor (NGF) [Electronic resource] : Clinical Trials. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02032147?cond=NGF&draw=3&rank=11>. – Data of access : 23.10.2020.
282. The Phase I Study of Recombinant Human Nerve Growth Factor Injection [Electronic resource] : Clinical Trials. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04232332?cond=NGF&draw=6&rank=42>. – Data of access: 23.10.2020.
283. Intravitreal NGF administration counteracts retina degeneration after permanent carotid artery occlusion in rat / S. Sivilia [et al.] // *BMC Neuroscience*. – 2009. – Vol. 10 : 52.
284. Clinical applications of NGF in ocular diseases / A. Lambiase [et al.] // *Arch. Italiennes de Biologie*. – 2011. – Vol. 149, № 2. – P. 283–292.
285. Topical nerve growth factor as a visual rescue strategy in pediatric optic gliomas: a pilot study including electrophysiology / B. Falsini [et al.] // *Neurorehabilitation and Neural Repair*. – 2011. – Vol. 25, № 6. – P. 512–520.

286. Evans, J. R. Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson`s disease / J. R. Evans, R. A. Barker // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2008. – Vol. 12, № 4. – P. 437–447.
287. Neurotrophins in mesial temporal lobe epilepsy with and without psychiatric comorbidities / L. Kandratavicius [et al.] // *J. Neuropathol. Experimental Neurology*. – 2013. – Vol. 72, № 11. – P. 1029-1042.
288. Fang, Q. Effects of nerve growth factor on neural cells in the epileptiform discharge region of the hippocampus in children with intractable epilepsy / Q. Fang, Chen Y.-H. // *Chinese journal of contemporary pediatrics*. – 2011. – Vol. 13, № 3. – P. 236-239.
289. Riikonen, R. Levels of cerebrospinal fluid nerve-growth factor differ in infantile autism and Rett syndrome / R. Riikonen, R. Vanhala // *Developmental Medicine & Child Neurology*. – 1999. – Vol. 41, № 3. – P. 148-52.
290. An elevation in the level of autoantibodies to nerve-growth factor in the blood serum of schizophrenic children / V. M. Bashina [et al.] // *Zhurnal Nevrologii i Psikhatrii imeni S. S. Korsakova*. – 1997. – Vol. 97, № 1. – P. 47–51.
291. The role of NGF and IL-2 serum level in assisting the diagnosis in first episode schizophrenia / P. Xiong [et al.] // *Psychiatry Research*. – 2011. – Vol. 189, № 1. – P. 72–76.
292. Intranasal nerve growth factor attenuates tau phosphorylation in brain after traumatic brain injury in rats / Q. Lv [et al.] // *J. of Neurological Sciences*. – 2014. – Vol. 345, № 1-2. – P. 48–55.
293. Apfel, S. C. Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold? / S. C. Apfel // *Intern. Rev. of Neurobiology*. – 2002. – Vol. 50. – P. 393–413.
294. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection / M. Chromek [et al.] // *Nature Medicine*. – 2006. – Vol. 12, № 6. – P. 636–641.
295. The impact of cathelicidin, the human antimicrobial peptide LL-37 in urinary tract infections / I. H. Babikir [et al.] // *BMC Infectious Disease*. – 2018. – Vol. 18, № 1: 17.
296. Low plasma level of cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18) predicts increased infectious disease mortality in patients undergoing hemodialysis / A. F. Gombart [et al.] // *Clinical Infectious Disease*. – 2009. – Vol. 48, № 4. – P. 418-424.
297. Activity of LL-37, CRAMP and antimicrobial peptide-derived compounds E2, E6 and CP26 against *Mycobacterium tuberculosis* / B. Rivas-Santiago [et al.] // *Intern. J. of Antimicrobial Agents*. – 2013. – Vol. 41, № 2. – P. 143–148.
298. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors / G. S. Tjabringa [et al.] // *Intern. Arch. of Allergy and Immunology*. – 2006, Vol. 140, № 2. – P. 103–112.

- 299.Schaller-Bals, S. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection / S. Schaller-Bals, A. Schulze, R. Bals // *Amer. J. Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2002. – Vol. 165, № 7. – P. 992–995.
- 300.Induction of the human cathelicidin LL-37 as a novel treatment against bacterial infections / A. M. van der Does [et al.] // *J. of Leukocyte Biology*. – 2012. – Vol. 92, № 4. – P. 735-742.
- 301.Effects of Vitamin D and Omega-3 Fatty Acids on Infectious Diseases and hCAP18 [Electronic resource] : *Clinical Trials*. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01758081?cond=LL37&draw=2&rank=7>. – Data of access: 23.10.2020.
- 302.LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria / O. Cirioni [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50, № 5. – P.1672–1679.
- 303.Efficacy of LL-37 and granulocyte colony-stimulating factor in a neutropenic murine sepsis due to *Pseudomonas aeruginosa* / O. Cirioni [et al.] // *Shock*. – 2008. – Vol. 30, № 4. – P. 443–448.
- 304.The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins / S. Tripathi [et al.] // *J. General Virology*. – 2013. – Vol. 94, Pt 1.– P. 40–49.
- 305.Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37 / P. G. Barlow [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 10: e25333.
- 306.Cathelicidins Have Direct Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus In Vitro and Protective Function In Vivo in Mice and Humans / S. M. Currie [et al.] // *The J. of Immunology*. – 2016. – Vol. 196, № 6. – P. 2699-2710.
- 307.Reinholz, M. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease / M. Reinholz, T. Ruzicka, J. Schaubert // *Annual Dermatology*. – 2012. – Vol. 24, № 2. – P. 126–135.
- 308.Evaluation of the Inhibitory Effects of Topical Ivermectin on Markers of Rosacea Specific Inflammation. [Electronic resource] : *Clinical Trials*. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02806414?> – Data of access : 23.10.2020.
- 309.An interferon gamma release assay specific for *Histoplasma capsulatum* to detect asymptomatic infected individuals: A proof of concept study / M. Rubio-Carrasquilla [et al.] // *Med. Mycology*. – 2019. – Vol. 57, № 6. – P. 724–732.
- 310.Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis / P. Y. Ong [et al.] // *New Engl. J. of Medicine*. – 2002. – Vol. 347, №15. – P. 1151-1160.
- 311.Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis / K. Edfeldt [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2006. – Vol. 26, № 7. – P. 1551–1557.

312. Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice / Y. Döring [et al.] // *Circulation Research*. – 2012. – Vol. 110, № 8. – P. 1052–1056.
313. The endogenous antimicrobial cathelicidin LL37 induces platelet activation and augments thrombus formation / M. F. Salamah [et al.] // *Blood Advances*. – 2018. – Vol. 2, № 21. – P. 2973–2985.
314. Efficacy of LL-37 Cream on Bacteria Colonization, Inflammation Response and Healing Rate of Diabetic Foot Ulcers [Electronic resource] : *Clinical Trials*. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04098562>. – Data of access : 23.10.2020.
315. Serum level of cathelicidin LL-37 is increased in euthymic patients with bipolar disorder irrespective of their cardio-metabolic status / A. Wysokiński [et al.] // *Revista de Psiquiatria Clínica*. – 2019. – Vol. 46, № 3. – P. 66–71.
316. Intratumoral Injections of LL37 for Melanoma [Electronic resource] : *Clinical Trials*. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02225366?cond=LL37&draw=2&rank=1>. ? – Data of access : 23.10.2020.
317. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System / ed.: D. N. Louis [et al.]. – Lyon: IARC Press, 2007. – 309.
318. Identification of U251 glioma stem cells and their heterogeneous stem-like phenotypes / S. Zhang [et al.] // *Oncological Letters*. – 2013. – Vol. 6, № 6. – P. 1649–1655.
319. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В. П. Божкова [и др.] ; под ред.: Б. П. Вепринцева, И. В. Викторова, Б. Я. Вильнера. – М. : Наука, 1988. – 317 с.
320. Characteristics of human infant primary fibroblast cultures from Achilles tendons removed post-mortem / M. C. Rohde [et al.] // *Forensic Science Intern*. – 2014. – Vol. 234. – P. 149–153.
321. *Animal Cell Culture : a Practical Approach* / R.I. Freshney [et al.] ; ed. J.R.W. Masters. – 3rd ed. – London : Oxford Univ. Press, 2000. – 315 p.
322. An autopsy case of limbic encephalitis with voltage-gated potassium channel antibodies / D. C. Park [et al.] // *Europ. J. of Neurology*. – 2007. – Vol. 14, № 10. – P. e5–e6.
323. Isolation and culture of adult human microglia within mixed glial cultures for functional experimentation and high-content analysis / A. M. Smith [et al.] // *Methods in Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 1041. – P. 41–51.
324. Prevention of the degeneration of human dopaminergic neurons in an astrocyte co-culture system allowing endogenous drug metabolism / L. Efremova [et al.] // *Brit. J. of Pharmacology*. – 2015. – Vol. 172, № 16. – P. 4119–4132.

325. CHRNA7 and CHRFA7A mRNAs: co-localized and their expression levels altered in the postmortem dorsolateral prefrontal cortex in major psychiatric disorders / Y. Kunii [et al.] // *Amer. J. of Psychiatry*. – 2015. – Vol. 172, № 11. – P. 1122–1130.
326. The novel pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6, synergistically enhances the apoptotic effects of carboplatin in drug sensitive and multidrug resistant neuroblastoma cells / J. C. Lennon [et al.] // *Biochem. Pharmacology*. – 2014. – Vol. 87, № 4. – P. 611–624.
327. Jiang, P. Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs / P. Jiang, R. Mukthavavam // *J. of Translational Medicine*. – 2014 – Vol. 17, № 12 : 13.
328. In vitro drug response and efflux transporters associated with drug resistance in pediatric high grade glioma and diffuse intrinsic pontine glioma / S. J. E. Veringa [et al.] // *PLOS One*. – 2013. – Vol. 8, № 4 : e61512.
329. Mullins, C. S. Patient-individual models of gliomas: establishment, characterization and applications : diss... doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) / C. S. Mullins. – Rostock, 2013. – 110 p.
330. Hyperstimulation of macropinocytosis leads to lysosomal dysfunction during exposure to methamphetamine in SH-SY5Y cells / A. Nara [et al.] // *Brain Research*. – 2012. – Vol. 1466. – P. 1–14.
331. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line / R. Markiewicz-Żukowska [et al.] // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2013. – Vol. 27, № 13 : 50.
332. Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line / J. Jakubowicz-Gil [et al.] // *Chemo-Biological Interactions*. – 2010. – Vol. 188, № 1. – P. 190–203.
333. Role of methamphetamine on glioblastoma cytotoxicity induced by doxorubicin and methotrexate / T. Capelôa [et al.] // *Neurotoxicological Research*. – 2014. – Vol. 26, № 3. – P. 216–227.
334. Indole and synthetic derivative activate chaperone expression to reduce polyq aggregation in sca17 neuronal cell and slice culture models / P-J. Kung [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2014. – Vol. 8. – P. 1929–1939.
335. Cui, L. Overexpression of IL-7 enhances cisplatin resistance in glioma / L. Cui, J. Fu, J. Ch-S. Pang // *Cancer Biology and Therapy*. – 2012. – Vol. 13, № 7. – P. 496–503.
336. Othman, R. T. Overcoming multiple drug resistance mechanisms in medulloblastoma / R. T. Othman, I. Kimishi, T. D. Bradshaw // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2014. – № 2 : 57.

337. Зайнутдинова, Э. М. Основы физиологии человека: учеб. пособие / Э. М. Зайнутдинова. – Уфа: Изд-во УГНТУ, 2006. – 105 с.
338. Салей, А. П. Практикум по физиологии с основами анатомии. Часть 1. Физиология человека / А. П. Салей, С. И. Гуляева, М. Ю. Мещерякова. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2002. – 81 с.
339. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays / T. Mosmann // *J. of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65 – P. 55–63.
340. Toxicity of Cisplatin-Loaded Poly Butyl Cyanoacrylate Nanoparticles in a Brain Cancer Cell Line: Anionic Polymerization Results / N. Mohamadi [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2017. – Vol. 18, № 3. – P. 629–632.
341. Chou, T-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies / T-C. Chou // *Pharmacological Rev.* – 2006. – Vol. 58, № 3. – P. 621-681.
342. Chemosensitivity testing with ChemoFx and overall survival in primary ovarian cancer / T. J. Herzog [et al.] // *Amer. J. of Obstetrical Gynecology*. – 2010. – Vol. 203, № 1. – P. 68 : e1-6.
343. In vitro chemosensitivity test using the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST) for malignant pleural mesothelioma: possibility of clinical application / M. Higashiyama [et al.] // *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2008. – Vol. 14, № 6. – P. 355–362.
344. Конопля, Н. Е. Лечение медуллобластомы у детей младше четырех лет / Н. Е. Конопля // *Мед. журн.* – 2009. – № 1. – С. 112–114.
345. Prognostic relevance of clinical and biological risk factors in childhood medulloblastoma : results of patients treated in the prospective multicenter trail HIT`91 / S. Rutkowski [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2007. – Vol. 13, № 9. – P. 2651–2657.
346. Shen, W. Mechanism of temozolomide-induced antitumor effects on glioma cells / W. Shen, J-A. Hu, J-Sh. Zheng // *J. of Intern. Medical Research*. – 2014. – Vol. 42, № 1. – P. 164–172.
347. Лекарственная чувствительность лейкозных клеток *ex vivo* и прогнозирование ответа пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом / А. И. Свирновский [и др.] // *Здравоохранение*. – 2010. – № 3. – С. 57–60.
348. Chemosensitivity testing of ovarian cancer using the histoculture drug response assay: sensitivity to cisplatin and clinical response / S. Nakada [et al.] // *Intern. J. of Gynecological Cancer*. – 2005. – Vol. 15, № 3. – P. 445–452.

349. Comparison of in vitro drug sensitivity by the differential staining cytotoxicity (DiSC) and colony-forming assays / M. C. Bird [et al.] // *Brit. J of Cancer*. – 1987. – Vol. 55, № 4. – P. 429–431.
350. Correlation between extreme drug resistance assay and response to primary paclitaxel and cisplatin in patients with epithelial ovarian cancer / G. H. Eltabbakh [et al.] // *Gynecological Oncology*. – 1998. – Vol. 70, № 3. – P. 392–397.
351. Kobayashi, H. Development of a new in vitro chemosensitivity test using collagen gel droplet embedded culture and image analysis for clinical usefulness / H. Kobayashi // *Recent Results Cancer Research*. – 2003. – Vol. 161. – P. 48–61.
352. Nagourney, R. A. Ex vivo programmed cell death and the prediction of response to chemotherapy / R. A. Nagourney // *Current Treatment Options in Oncology*. – 2006. – V. 7, № 2. – 103–110.
353. Prediction of chemotherapy response with platinum and taxane in the advanced stage of ovarian and uterine carcinosarcoma: a clinical implication of in vitro drug resistance assay / K. Matsuo [et al.] // *Amer. J. of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 33, № 4. – P. 358–363.
354. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours / S. A. O'Toole [et al.] // *Cancer Detection and Prevention*. – 2003. – Vol. 27, № 1. – P. 47–54.
355. Interleukin-6 and soluble IL-6 receptor levels as markers of disease extent and prognosis in neuroblastoma / A. Egler [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol. 14, № 21. – P. 7028–7034.
356. Боголепов, Н. Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга : учеб. пособие / Н. Н. Боголепов. – М. : Наука, 1976. – 72 с.
357. Arismendi-Morillo, G. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in gliomas and their vascular microenvironment / G. Arismendi-Morillo // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 2011. – Vol. 1807, № 6. – P. 602–608.
358. Современные методы исследования апоптотической гибели клеток (обзор) / Т.Ф. Сергеева [и др.] // *СТМ*. – 2015. – Т. 7, №3. – С. 172–182.
359. Classification of cell death / G. Kroemer [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. – 2009. – Vol. 16, № 1. – P. 3–11.
360. Goldstein, P. Cell death by necrosis : towards a molecular definition / P. Goldstein, G. Kroemer // *Trends in Biochem. Sciences*. – 2007. – Vol. 32, № 1. – P. 37–43.
361. Active Ras triggers death in glioblastoma cells though hyperstimulation of macropinocytosis / J. H. Overmeyer [et al.] // *Molecular Cancer Research*. – 2008. – Vol. 6, № 6. – P. 965–977.

362. Клиническая и прогностическая значимость показателей апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных системной красной волчанкой / Н. Ф. Сорока [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2007. – № 3. – С. 5–11.
363. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain: Product Information / Molecular Probes, Inc. – 1999. – 3 p.
364. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain / Molecular Probes, Inc. – 2006. – 5 p.
365. Evaluation of YO-PRO-1 as an early marker of apoptosis following radiofrequency ablation of colon cancer liver metastases / S. Fujisawa [et al.] // Cytotechnology. – 2014. – Vol. 66, № 2. – P. 259–273.
366. YO-PRO™-1 Iodide (491/509). [Electronic resource] : Invitrogen, USA. – Mode of access: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Y3603>. – Data of access: 18.10.2020.
367. Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric: technical bulletin / Sigma-Aldrich, Inc. – 2004. – 4 p.
368. Presence and localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat lacrimal gland / E. Ghinelli [et al.] // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2003. – Vol. 44, № 8. – P. 3352–3357.
369. Low-level copy number changes of myc genes have a prognostic impact in medulloblastoma / K. Zitterbart [et al.] // J. of Neuro-Oncology. – 2011. – Vol. 102, № 1. – P. 25–33.
370. Biostatistics : a methodology for the health sciences / G. van Belle [et al.] ; eds: L. D. Fisher, G. van Belle. – Canada: John Wiley and Sons Inc., 2004. – 889 p.
371. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц – М. : Практика, 1999. – 459 с.
372. IA Carboplatin + Radiotherapy in Relapsing GBM. [Electronic resource] : Clinical Trials. – Mode of access: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03672721>. – Data of access: 11.11.2020
373. Glioblastoma. Chap. 11. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. Ed. by S. De Vleeschouwer. Codon Publications Brisbane, Australia, 2017. – 452 p.
374. Neoadjuvant cisplatin and etoposide, with or without tamoxifen, prior to radiotherapy in high-grade gliomas: a single-center experience / R. Díaz [et al.] // Clinical Trial Anticancer Drugs. – 2005. – Vol. 16, № 3. – P. 323–329.
375. Cervical cord ependymoma with numerous microrosettes / N. Yoshimura [et al.] // Brain Tumor Pathology. – 1997. – Vol. 14, № 2. – P. 145–151.
376. Intranuclear microtubules are hallmarks of a unusual form of cell death in cisplatin-treated C6 glioma cells / D. Krajci [et al.] // Histochemistry and Cell Biology. – 2006. – Vol. 125, № 1/2. – P. 183–191.
377. Калиниченко, С.Г. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе / С.Г. Калиниченко, Н.Ю. Матвеева // Морфология. – 2007. – Т. 131, № 2. – С. 16–28.

378. Григорьев, Д. Г. Новая гистологическая классификация опухолей центральной нервной системы / Д. Г. Григорьев, Е. Д. Черствый // *Здравоохранение*. – 2008. – № 7. – С. 21–26.
379. Rodriguez, F.J. Anaplastic medulloblastoma with granular cell change / F.J. Rodriguez, B. W. Scheithauer // *Acta Neurophatologica*. – 2007. – Vol. 113, № 1. – P. 95–99.
380. Astroblastoma in childhood : pathological and clinical analysis / R. Navarro [et al.] // *Child's Nervous System*. – 2005. – Vol. 21, № 3. – P. 211–220.
381. Eyden, B. Electron microscopy in the diagnosis of tumours / B. Eyden // *Current Diagnostic Pathology*. – 2002. – Vol. 8, № 4. – P. 216–224.
382. Temozolomide and 13-cis retinoic acid in patients with anaplastic gliomas : a prospective single-arm monocentric phase-II study (RNOP-05) / O. Grauer [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 2011. – Vol. 104, № 3. – P. 801–809.
383. Protein markers predict survival in glioma patients / L. C. Stetson [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2016. – Vol. 15, № 7. – P. 2356–2365.
384. Fasting Enhances the Response of Glioma to Chemo- and Radiotherapy / F. Safdie [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 9 : e44603.
385. Chemotherapeutic effect of Tamoxifen on Temozolomide-Resistant Gliomas / W. He [et al.] // *Anticancer Drugs*. – 2015. – Vol. 26, № 3. – P. 293–300.
386. The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation / J. Portnow [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – Vol. 15, № 22. – P. 7092-7098.
387. Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas / S. Ueda [et al.] // *J. of Neurosurgery*. – 2004. – Vol. 101, № 4. – P. 659-663.
388. Identification of a transient state during the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma / M. Rabé [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2020. – Vol. 11, Article number: 19.
389. Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma / C. Gratas [et al.] // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5. – P. 2428–2435.
390. Klinger, N. V. Therapeutic Potential of Curcumin for the Treatment of Brain Tumors / N. V. Klinger, S. Mittal // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 2016, Article ID : 9324085.
391. The synergic antitumor effects of paclitaxel and temozolomide co-loaded in mPEG-PLGA nanoparticles on glioblastoma cells / Y. Xu [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, №. 15. – P. 20890-20901.

392. Acquisition of temozolomide resistance by the rat C6 glioma cell line increases cell migration and side population phenotype / Y. Xu [et al.] // *Oncological Reports*. – 2019. – Vol. 42, № 6. – P. 2355–2362.
393. Discovery and Characterization of R/S-N-3-Cyanophenyl-N'-(6-tertbutoxycarbonylamino-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-4-yl)urea, a New Histone Deacetylase Class III Inhibitor Exerting Antiproliferative Activity against Cancer Cell Lines / M. Schnekenburger [et al.] // *J. of Med. Chemistry*. – 2017. – Vol. 60. – P. 4714–4733.
394. Concomitant treatment of F98 glioma cells with new liposomal platinum compounds and ionizing radiation / G. Charest [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 2010. – Vol. 97, № 2. – P. 187-193.
395. Weyerbrock, A. Growth inhibition and chemosensitization of exogenous nitric oxide released from NONOates in glioma cells in vitro / A. Weyerbrock, B. Baumer, A. Papazoglou // *J. Neurosurgery*. – 2009. – Vol. 110, № 1. – P. 128-136.
396. Giakoumettis, D. C6 cell line: the gold standard in glioma research / D. Giakoumettis, A. Kritis, N. Foroglou // *Hippokratia*. – 2018. – Vol. 22, № 3. – P. 105–112.
397. Huet, S. P-glycoprotein overexpression cannot explain the complete doxorubicin-resistance phenotype in rat glioblastoma cell lines / S. Huet, B. Schott, J. Robert // *Brit. J. of Cancer*. – 1992. — Vol. 65, № 4. – P. 538–544.
398. Control of Proliferation and Survival of C6 Glioma Cells with Modification of the Nerve Growth Factor Autocrine System / T. Watanabe [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 1999. – Vol. 41. – P. 121-128.
399. Mitogenesis in Glioblastoma Multiforme Cell Lines: A Role for NGF and its TrkA Receptors / H. Singer [et al.] // *J. of Neuro-Oncology*. – 1999. – Vol. 45. – P. 1-8.
400. Weis, C, Nerve Growth Factor Plays a Divergent Role in Mediating Growth of Rat C6 Glioma Cells via Binding to the P75 Neurotrophin Receptor / C. Weis, B. Wiesenhofer, C. Humpel // *Neuro-Oncology*. – 2002. – Vol. 56. – P. 59-67.
401. Emmett, C. J. Evaluation of human astrocytoma and glioblastoma cell lines for nerve growth factor release / C. J. Emmett, P. A. McNeeley, R. M. Jonson // *Neurochemistry Intern*. – 1997. – Vol. 30, № 4-5. – P. 465-474.
402. Engraftment of C6-2B cells into the striatum of ACI nude rats as a tool for comparison of the in vitro and in vivo phenotype of a glioma cell line / C. Tornatore [et al.] // *Cell Transplantation*. – 1997. – Vol. 6. – P. 317-326.
403. Chou, T. T., A novel apoptotic pathway induced by nerve growth factor-mediated TrkA activation in medulloblastoma / T. T. Chou, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee // *J. of Biol. Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, № 1. – P. 565-570.

404. Localization of NGF and TrkA at mitotic apparatus in human glioma cell line U251 / Z. Zhang [et al.] // *Biochem. and Biophys. Research Communications*. – 2005. – Vol. 337, № 1. – P. 68-74.
405. Expression of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in astrocytomas. / T-T. Liu [et al.] // *Oncological Letters*. – 2018. – Vol. 15, № 1. – P. 533-537.
406. Expression and biological significance of nerve growth factor and its receptor in human glioma cell line U251 / Y. Yang [et al.] // *Chinese J. of Clinical Rehabilitation*. – 2006. – Vol. 10, № 38. – P. 94-96.
407. The p75 Neurotrophin Receptor Is a Central Regulator of Glioma Invasion / A. L. M. Johnston [et al.] // *PLoS Biology*. – 2007. – Vol. 5, № 8 : e212.
408. Study on reversion of malignant phenotype of glioma by siRNA targeting p75 neurotrophin receptor / Z-k. Zhao [et al.] // *Chinese J. of Pathology*. – 2010. – Vol. 39, № 6. – P. 400–404.
409. 5-Fluorouracil signaling through a calcium–calmodulin-dependent pathway is required for p53 activation and apoptosis in colon carcinoma cells. / G. Can [et al.] // *Oncogene*. – 2013. Vol. 32, № 38. – P. 4529–4538.
410. Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer. / S. X. Ren [et al.] // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72, № 24. – P. 6512–6523.
411. Colle, J-H. Antitumor and antibacterial properties of virally encoded cationic sequences/ J-H. Colle, B. Périchon, A. Garcia // *Biologics*. – 2019. – Vol. 13. – P. 117–126.
412. Colle, J.H. The new APOE analog DPT-Cog inhibits PI3k/Akt-dependant survival of human radio-resistant U87G glioblastoma cells/ J. H. Colle, A. Garcia // *Current Topics in Pharmacology*. – 2016. – Vol. 20. – P. 33–37.
413. Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes / S. Resjö [et al.] // *Cell Signaling*. – 2002. – Vol. 14, № 3. – P. 231-238.
414. Cathelicidin LL-37 Promotes or Inhibits Cancer Cell Stemness Depending on the Tumor Origin. / G. T. Coelho Neto [et al.] // *Oncomedicine*. – 2016. – Vol. 1. – P. 14-17.
415. DNA damage-induced sustained p53 activation contributes to inflammation-associated hepatocarcinogenesis in rats / H. X. Yan [et al.] // *Oncogene*. – 2013. – Vol. 32, № 38, – P. 4565-4571.
416. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma / A. Schramm [et al.] // *Cancer Letters*. – 2005. – Vol. 228, № 1/2. – P. 143–153.
417. Nerve growth factor (NGF) exerts its pro-apoptotic effect via the P75NTR receptor in a cell cycle-dependent manner / F. Bono [et al.] // *FEBS Letters*. – 1999. – Vol. 457, № 1. – P. 93–97.
418. Cell cycle phase-specific surface expression of nerve growth factor receptors TrkA and p75 (NTR) / J. I. Urdiades [et al.] // *The J. of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 18, № 17. – P. 6767–6775.

419. Trk A, B, and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma / Y. Wang [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 1998. – Vol. 96, № 4. – P. 357–364.
420. Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by v-src oncogenes / S. Alema [et al.] // *Nature*. – 1985. – Vol. 316, № 6028. – P. 557–559.
421. Krüttgen, A. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias / A. Krüttgen, I. Schneider, J. Weis // *Brain Pathology*. – 2006. – Vol. 16, № 4. – P. 304–310.
422. Role of STAT3 in in vitro transformation triggered by TRK oncogenes / C. Miranda [et al.] // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, № 3. – P. e9446.
423. AZ64 inhibits TrkB and enhances the efficacy of chemotherapy and local radiation in neuroblastoma xenografts / R. Iyer [et al.] // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2012. – Vol. 70, № 3. – P. 477–486.
424. Signal transduction pathways through TRK-A and TRK-B receptors in human neuroblastoma cells / T. Sugimoto [et al.] // *Jap. J. of Cancer Research*. – 2001. – Vol. 92, № 2. – P. 152–160.
425. Пептиды системы врожденного иммунитета модулируют цитотоксическое действие противоопухолевых антибиотиков / М. С. Жаркова [и др.] // *Росс. иммунологический журн.* – 2016. – Т. 10, № 2. – С. 548–550.
426. Purification of α -synuclein containing inclusions from human post mortem brain tissue / A. McCormack [et al.] // *J. of Neuroscience Methods*. – 2016. – Vol. 266. – P. 141–150.
427. Prolyl oligopeptidase colocalizes with α -synuclein, β -amyloid, tau protein and astroglia in the post-mortem brain samples with Parkinson's and Alzheimer's diseases / M. J. Hannula [et al.] // *Neuroscience*. – 2013. – Vol. 242. – P. 140–150.
428. Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease / M. Orre [et al.] // *Brain*. – 2013. – Vol. 136, Pt. 5. – P. 1415–1431.
429. Induction of pluripotent stem cells from autopsy donor-derived somatic cells / B. E. Hjelm [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2011. – Vol. 502. – P. 219–224.
430. Advancing drug discovery for neuropsychiatric disorders using patient-specific stem cell models / S. J. Haggarty [et al.] // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2016. – Vol. 73. – P. 104–115.
431. Prevention of the degeneration of human dopaminergic neurons in an astrocyte co-culture system allowing endogenous drug metabolism / L. Efremova [et al.] // *Brit. J. of Pharmacology*. – 2015. – Vol. 172, № 16. – P. 4119–4132.
432. van Noort, J.M. Human glial cell culture models of inflammation in the central nervous system / J.M. van Noort // *Drug Discovery Today*. – 2006. – Vol. 11, № 1/2. – P. 74–80.

433. Establishment of microglial cell cultures derived from postmortem human adult brain tissue: immunophenotypical and functional characterization / C. J. de Groot [et al.] // *Microscopical Reserch Techology*. – 2001. – Vol. 54, № 1. – P. 34–39.
434. Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells / F. Jin [et al.] // *Brain Research*. – 2010. – Vol. 1336. – P. 103-111.
435. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells / M. Katayama [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. – 2007. – Vol. 14, № 3. – P. 548-558.
436. Comparison of cell-based assays to quantify treatment effects of anticancer drugs identifies a new application for Bodipy-L-cystine to measure apoptosis / N. Kumar [et al.] // *Sci. Reports*. – 2018. – Vol. 8, Article number: 16363.
437. Interleukin-6 trans-signaling induces VEGF synthesis partly via Janus kinases-STAT3 pathway in human mesothelial cells / X. Yang [et al.] // *Nephrology (Carlton)*. – 2017. – Vol. 22, № 2. – P. 150–158.
438. Choi, K.C. Mitogen-activated protein kinases in normal and (pre)neoplastic ovarian surface epithelium / K. C. Choi, N. Auersperg, P. C. Leung // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2003. – Vol.1 : 71.
439. Epigenetic regulation of the miR142-3p/interleukin-6 circuit in glioblastoma / G. Y. Chiou [et al.] // *Molecular Cell*. – 2013. – Vol. 52, № 5. – P. 693–706.
440. Overall survival and clinicopathological characteristics of patients with breast cancer in relation to the expression pattern of HER-2, IL-6, TNF- α and TGF- β 1 / G. Tripsianis [et al.] // *Asian Pacific J. of Cancer Prevention*. – 2013. – Vol. 14, № 11. – P. 6813–6820.
441. RANTES and IL-6 cooperate in inducing a more aggressive phenotype in breast cancer cells / M. Gallo [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, № 25. – P. 17543–17553.
442. Analysis of interleukin-6 gene expression in primary human gliomas, glioblastoma xenografts and glioblastoma cell lines / A. Sasaki [et al.] // *Brain Tumor Pathology*. – 2001. – Vol. 18, № 1. – P. 13–21.
443. Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma / Y. Shan [et al.] // *Intern. J. of Clinical and Experimental Medicine*. – 2015. – Vol. 8, № 6. – P. 9114–9120.
444. Interleukin 6 augments lung cancer chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated/NF-kappaB pathway activation / H. Q. Yan [et al.] // *Cancer Science*. – 2014. – Vol. 105, № 9. – P. 1220–1227.

445. IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines / Q. Liu [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2010. – Vol. 100, № 2. – P. 165–176.
446. Association between Interleukin-6 Levels and Perioperative Fatigue in Gastric Adenocarcinoma Patients / J-M. Wu [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2019. – Vol. 8, № 4: 543.
447. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells / Y. Wang [et al.] // *Cancer Letters.* – 2010. – Vol. 295, № 1. – P. 110–123.
448. Interleukin-6 as an emerging regulator of renal cell cancer / K. Kamińska [et al.] // *Urological Oncology.* – 2015. – Vol. 33, № 11. – P. 476–485.
449. Interleukin-6 protects against paclitaxel, cisplatin and vincristine-induced neuropathies without impairing chemotherapeutic activity / N. Callizot [et al.] // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* – 2008. – Vol. 62, № 6. – P. 995–1007.
450. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller [et al.] // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1813, № 5. – P. 878–888.
451. Analysis of interleukin (IL)-8 expression in human astrocytomas : associations with interleukin-6, cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor and microvessel morphometry / V. Samaras [et al.] // *Human Immunology.* – 2009. – Vol. 70, № 6. – P. 391–397.
452. Identification of interleukin-6 as a factor that induces neurite outgrowth by PC12 cells primed with NGF / S. Inara [et al.] // *J. of Biochemistry.* – 1996. – Vol. 120, № 5. – P. 865–868.
453. Interleukin-6-associated inflammatory processes in Alzheimer's disease : new therapeutic options / M. Hüll [et al.] // *Neurobiology of Aging.* – 1996. – Vol. 17, № 5. – P. 795–800.
454. Kovacs, E. Investigation of interleukin-6 (IL-6) soluble receptor (sIL-6R) and soluble gp130 (sgp130) in sera of cancer patients / E. Kovacs // *Biomedicine and Pharmacotherapy.* – 2001. – Vol. 55, № 7. – P. 391–396.
455. Cytokine-induced transcription of protein-tyrosine-phosphatases in human astrocytoma cells / G. Schumann [et al.] // *Molecular Brain Research.* – 1998. – Vol. 62, № 1. – P. 56–64.
456. Retinal astrocyte differentiation mediated by leukemia inhibitory factor in cooperation with bone morphogenetic protein 2 / M. Fukushima [et al.] // *Intern. J. of Developmental Neuroscience.* – 2009. – Vol. 27, № 7. – P. 685–690.
457. Hirano, A. Fine structure of neuronal and glial processes in neuropathology, a personal historical note / A. Hirano // *Clinical Neurology.* – 2009. – Vol. 49, № 11. – P. 719–723.
458. The profile of Th17 subset in glioma / J. Hu [et al.] // *Intern. Immunopharmacology.* – 2011. – Vol. 11, № 9. – P. 1173–1179.
459. Чернов, А. Н. Интенсивность секреции интерлейкина-6 клетками первичных культур нейроэпителиальных опухолей – маркер их чувствительности к химиопрепаратам и

- фактору роста нервов / А. Н. Чернов // Клеточные культуры. Информ. бюл. Ин-та цитологии РАН, СПб. – 2013. – Вып. 29. – С. 54-65.
460. Archer, T. C. Medulloblastoma: molecular classification-based personal therapeutics / T. C. Archer, E. L. Mahoney, S. L. Pomeroy // *Neurotherapeutics*. – 2017. – Vol. 14, № 2. – P. 265–273. (455
461. The role of nerve growth factor in caspase-dependent apoptosis in human BE(2)C neuroblastoma / J. L. Holub [et al.] // *J. of Pediatric Surgery*. – 2011. – Vol. 46, № 6. – P. 1191–1196.
462. Neurotrophin receptors and heparanase: a functional axis in human medulloblastoma invasion / D. Marchetti [et al.] // *J. of Experimental Clinical Cancer Research*. – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 5–23.
463. p75^{NTR} enhances PC12 cell tumour growth by a non-receptor mechanism involving downregulation of cyclin D2 / M. D. Fritz [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2006. – Vol. 312, № 17. – P. 3287–3297. (
464. Novel p75 neurotrophin receptor ligand stabilizes neuronal calcium, preserves mitochondrial movement and protects against HIV associated neuropathogenesis / R. B. Meeker [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2016. – Vol. 275, Pt. 1. – P. 182–198.
465. Wang, W. The role of nerve growth factor and its receptors in tumorigenesis and cancer pain / W. Wang, J. Chen, X. Guo // *Bioscience Trends*. – 2014. – Vol. 8, № 2. – P. 68–74.
466. Heterodimerization of p45-p75 modulates p75 signaling: structural basis and mechanism of action / M. Vilar [et al.] // *PLoS Biology*. – 2014. – Vol. 12, № 8 : e1001918.
467. Kruppel-like factor 7 overexpression suppresses hematopoietic stem and progenitor cell function / L. G. Schuettpelz [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 120, № 15. – P. 2981–2989.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Группы исследования и клинические данные пациентов

Таблица 1.1

Группа 1. Информация о пациентах с пилоцитарной астроцитомой, Gr I (Код ICD-O 9421/1)

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства
1	26601	Жен.	11 лет	05.11.2008	Червь мозжечка	Субтотальное
2	6396	Жен.	4 года	18.03.2009	Полушарие мозжечка	Тотальное
3	9878	Жен.	3 года	24.04.2009	Червь и оба полушария мозжечка	Тотальное
4	15977	Жен.	13 лет	07.07.2009	Теменная доля	Тотальное
5	16853	Муж.	3 года	15.07.2009	Червь мозжечка, пинеальная область	Тотальное
6	18662	Муж.	4 года	04.08.2009	Четвертый желудочек	Тотальное
7	19366	Жен.	11 лет	13.08.2009	Полушарие мозжечка	Тотальное
8	28671	Жен.	5 лет	24.11.2009	Червь и медиальные отделы полушарий мозжечка и его ножки справа	Субтотальное
9	32262	Муж.	1 год	06.01.2010	Полушарие мозжечка	Тотальное
10	8511	Жен.	6 лет	06.04.2010	Третий желудочек	Тотальное
11	14164	Жен.	10 лет	15.06.2010	Полушарие мозжечка	Тотальное
12	13942	Жен.	15 лет	16.06.2010	Четвертый желудочек и пинеальная область	Субтотальное
13	14474	Жен.	3 года	17.06.2010	Зрительная хиазма	Частичное
14	15276	Жен.	14 лет	29.06.2010	Полушарие мозжечка	Тотальное
15	18119	Муж	1 год	10.08.2010	Зрительные пути с ростом в правую височную область	Частичное

Продолжение таблицы 1.1

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства
16	20424	Муж	14 лет	02.09.2010	Левое полушарие мозжечка	Тотальное
17	24247	Муж.	14 лет	18.10.2010	Полушарие мозжечка	Тотальное
18	25040	Муж.	3 года	26.10.2010	Глубокие отделы левого полушария мозжечка	Тотальное
19	28758	Жен.	8 лет	03.12.2010	Червь мозжечка	Тотальное
20	29381	Муж.	14 лет	15.12.2010	Теменная доля	Тотальное
21	29978	Муж.	16 лет	17.12.2010	Полушарие мозжечка	Тотальное
22	30149	Муж.	12 лет	21.12.2010	Полушарие мозжечка	Тотальное
23	31300	Муж.	12 лет	30.12.2010	полушария мозжечка	Тотальное
24	7166	Муж.	5 лет	24.03.2011	Полушарие мозжечка	Субтотальное
25	16152	Жен.	10 лет	12.07.2011	Полушарие мозжечка	Тотальное
26	16113	Жен.	4 года	13.07.2011	Третий желудочек, хиазма и зрительные нервы	Частичное
27	16347	Муж.	16 лет	19.07.2011	Пинеальная область, третий желудочек распространение в заднюю черепную ямку и четвертый желудочек	Субтотальное
28	17660	Муж.	14 лет	28.07.2011	Кистозная опухоль, полушарие мозжечка	Тотальное
29	24227	Муж.	10 лет	14.10.2011	Кистозная опухоль, полушарие мозжечка	Тотальное
30	3269	Муж.	7 лет	01.02.2012	Червь и полушарие мозжечка	Тотальное
31	1136	Муж.	5 лет	07.02.2012	Дно 3-го желудочка	Субтотальное

Окончание таблицы 1.1

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства
32	9359	Жен.	1 год	05.04.2012	Левый мосто-мозжечковый угол.	Субтотальное
33	10969	Жен.	15 лет	12.04.2012	Лобная доля	Тотальное
34	13899	Жен.	3 года	10.05.2012	Червь мозжечка	Тотальное
35	15878	Жен.	13 лет	04.06.2012	Четвертый желудочек	Субтотальное
36	19057	Муж.	6 лет	18.07.2012	Глубокие отделы правого полушария мозжечка	Биопсия
37	23336	Муж.	12 лет	15.08.2012	Кистозная опухоль теменной доли	Тотальное
38	23917	Муж.	8 лет	22.08.2012	Четвертый желудочек	Субтотальное
39	25556	Муж.	9 лет	04.09.2012	Полушарие мозжечка	Тотальное
40	13456	Муж.	3 года	07.12.2012	Червя и правого полушария мозжечка	Тотальное
41	399	Жен	4 года	26.03.2013	Червь и правое полушарие мозжечка	Тотальное
42	511	Муж	3 года	15.04.2013	Правое полушарие мозжечка	Тотальное

Таблица 1.2

Группа 2. Информация о пациентах с анапластической астроцитомой, Gr III (Код ICD-O 9401/3)

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли на терапию
1	5652	Муж.	14 лет	16.03.2009	Правое полушарие мозжечка	Тотальное	НПТ-GBM-D	Ремиссия
2	13687	Муж	9 лет	17.07.2009	Затылочная доля	Частичное	НПТ-GBM-D	Стабилизация
3	30989	Жен.	1 год	23.12.2009	Третий желудочек	Частичное	НПТ-GBM-D	Ремиссия
4	3063	Муж	12 лет	05.02.2010	Правая теменная доля	Субтотальное	НПТ-GBM-D	Прогрессия
5	20422	Муж.	12 лет	03.09.2010	Валик и мозолистое тело, распространение в базальные ганглии	Биопсия	НПТ-GBM-D	Стабилизация
6	3152	Жен	5 лет	11.02.2011	Краниоспинальная опухоль ската и левого мосто-мозжечкового угла	Субтотальное	НПТ-GBM-D	Стабилизация
7	12796	Муж.	7 лет	31.05.2011	Правая лобно-височная область	Субтотальное	НПТ-GBM-D	Стабилизация
8	14792	Жен.	3 года	18.05.2012	Ствол мозга с распространением в полость 4-го желудочка	Субтотальное	НПТ-2000	Стабилизация
9	14610	Жен.	15 лет	06.08.2013	Левого таламуса	Биопсия	Индивидуальный, темодал	Ремиссия

Таблица 1.3

Группа 3. Информация о пациентах с глиобластомой, Gr IV (Код ICD-O 9440/3)

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли на терапию
1	10845	Муж.	12 лет	08.05.2009	Глубоких отделов правого полушария мозга	Частичное	НПТ-GBM-D	Прогрессия
2	988	Муж.	5 лет	21.01.2010	Левая теменная область	Тотальное	НПТ-GBM-D	Ремиссия
3	4267	Муж.	4 года	18.02.2010	Третий желудочек	Тотальное	НПТ-GBM-D	Ремиссия
4	12505	Муж.	12 лет	27.05.2010	Левая височная доля	Тотальное	НПТ-GBM-D	Ремиссия
5	12714	Муж.	16 лет	28.12.2010	Затылочно-теменная область	Тотальное	Индивидуальный, темодал, иринотекан бевацумаб	Прогрессия
6	7032	Муж.	16 лет	23.03.2011	Левый и правый таламусы	Частичное	НПТ-GBM-D	Стабилизация
7	24420	Муж.	1 год	17.10.2011	Левая лобно-височная доля	Субтотальное	Индивидуальный, темодал	Стабилизация
8	130	Муж.	12 лет	31.01.2013	Опухоль левой лобно-теменной области	Тотальное	-	Ремиссия -
9	14704	Муж.	15 лет	22.08.2013	Правая лобно- височная область	Частичное	Индивидуальный, темодал	Прогрессия

Таблица 1.4

Группа 4. Информация о пациентах с медуллобластомой, GrIV (Код ICD-O 9470/3)

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли на терапию
1	31068	Муж.	7 лет	26.12.2008	Червь мозжечка	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
2	5007	Муж.	4 года	02.03.2009	Левое полушарие мозжечка	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
3	13405	Муж	3 года	14.04.2009	Четвертый желудочек, прорастание в ствол мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
4	12690	Муж.	1 год	26.05.2009	Мозжечок и ствол головного мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
5	15835	Муж.	8 лет	09.07.2009	Четвертый желудочек, вращение в ствол головного мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
6	17910	Жен.	7 лет	28.07.2009	Червь и левое полушарие мозжечка	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
7	18788	Муж.	8 лет	07.08.2009	Четвертый желудочек и червь мозжечка с вращением в ствол головного мозга (ТЗбст.)	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
8	22328	Жен.	3 года	15.09.2009	Четвертый желудочек и и правый мосто-мозжечковый угол, с ТЗМ2	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Прогрессия
9	27226	Жен.	7 лет	10.11.2009	Червь мозжечка, четвертый желудочек	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
10	31590	Муж.	6 лет	29.12.2009	Червь мозжечка, четвертый желудочек	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
11	2417	Муж.	6 лет	29.01.2010	Четвертый желудочек	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
12	12356	Жен.	8 лет	04.03.2010	Мозжечок	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия

Продолжение таблицы 1.4

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли на терапию
13	7233	Муж	1 год	22.03.2010	Червь мозжечка	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
14	11515	Муж.	10 лет	12.05.2010	Червь мозжечка, четвертый желудочек	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
15	20195	Муж.	1 год	26.08.2010	Червь мозжечка, вращение в средние его ножки с двух сторон	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
16	23721	Муж.	1 год	06.10.2010	Червь мозжечка и медиальные отделы обоих его полушарий	Тотальное	CNS Grade 3-4	Прогрессия
17	23866	Муж.	9 лет	12.10.2010	Четвертый желудочек и ствол головного мозга, множественные метастазы по полушариям мозжечка и в шейный отдел спинного мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
18	1237	Муж.	4 года	15.01.2011	Задняя черепная ямка, четвертый желудочек	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
19	6	Жен.	12 лет	15.03.2011	Полушарие мозжечка	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
20	8069	Жен.	10 лет	07.04.2011	Задняя черепная ямка	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
21	10701	Жен.	1 год	04.05.2011	Задняя черепная ямка	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
22	15348	Муж.	5 лет	29.06.2011	Полушарие мозжечка	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
23	20595	Муж.	5 лет	13.09.2011	Полушарие мозжечка	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
24	21667	Муж.	7 лет	16.09.2011	Задняя черепная ямка	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
25	26519	Муж.	4 года	09.11.2011	Червь мозжечка и четвертый желудочек вращение в ствол головного мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
26	1731	Муж.	2 года	18.01.2012	Червь мозжечка, вращение в его ножки с двух сторон и ствол мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация

Окончание таблицы 1.4

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли на терапию
27	2289	Жен.	12 лет	24.01.2012	Сосудистое сплетение и четвертый желудочек	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
28	3396	Жен.	1 год	02.02.2012	Полушарие мозжечка и его червь, распространение в четвертый желудочек	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
29	8228	Муж.	6 лет	03.02.2012	Четвертый желудочек	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
30	13181	Муж.	6 лет	24.04.2012	Червь мозжечка	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
31	15923	Муж.	3 года	07.06.2012	Четвертый желудочек	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
32	16963	Муж.	4 года	12.06.2012	Четвертый желудочек, вращение в ствол головного мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
33	28164	Жен.	9 лет	25.09.2012	Червь мозжечка, вращение в полость четвертого желудочка и ножки мозжечка	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
34	29346	Муж.	6 лет	05.10.2012	Червь мозжечка, распространение в ствол головного мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
35	53	Муж.	4 года	29.11.2012	Четвертый желудочек, вращение в ствол головного мозга и метастазирование по коре мозжечка (ТЗbM2)	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
36	13599	Муж.	3 года	12.01.2013	Опухоль задней черепной ямки	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия
37	13796	Жен.	17 лет	24.07.2013	Четвертый желудочек, вращение в ствол головного мозга	Субтотальное	CNS Grade 3-4	Стабилизация
38	14570	Муж.	6 лет	01.08.2013	Объемное образование задней черепной ямки	Тотальное	CNS Grade 3-4	Ремиссия

Таблица А1.5

Информация о пациентах с эпендимомой Gr II (Код ICD-O 9391/3)

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли на терапию
1	27423	Муж.	1 год	13.11.2008	Червь мозжечка	Частичное	Ependimom-99, SIOP	Прогрессия
2	12886	Муж.	1 год	03.06.2009	Червь мозжечка	Частичное	НИТ-2000	Стабилизация
3	28489	Муж.	1 год	20.11.2009	Правое полушарие головного мозга	Субтотальное	НИТ-2000	Стабилизация
4	2488	Муж.	1 год	02.02.2010	Четвертый желудочек, ствол мозга	Субтотальное	НИТ-2000	Ремиссия
5	7444	Муж.	13 лет	24.03.2010	Третий желудочек	Тотальное	Лечение не проводилось	
6	11108	Муж.	1 год	06.05.2010	Четвертый желудочек и ствол головного мозга	Частичное	НИТ-2000	Прогрессия
7	20432	Муж.	3 года	01.09.2010	Полушарие мозжечка	Тотальное	НИТ-2000	Ремиссия
8	27798	Муж.	2 года	25.11.2010	Четвертый желудочек, вращение в ствол головного мозга	Субтотальное	НИТ-2000	Стабилизация
9	11261	Жен.	16 лет	12.05.2011	Четвертый желудочек, вращение в ствол головного мозга	Субтотальное	НИТ-2000	Стабилизация
10	14949	Муж.	1 год	05.07.2011	Четвертый желудочек и левый мосто-мозжечковый угол, вращение в ствол мозга	Частичное	НИТ-2000	Прогрессия

Окончание таблицы 1.5

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли
11	20562	Муж.	3 года	06.09.2011	Четвертый желудочек, вращение в ствол головного мозга (ТЗбМх)	Субтотальное	НПТ-2000	Стабилизация
12	22126	Муж.	1 год	22.09.2011	Продолговатый мозг, рост в полость четвертого желудочка	Частичное	НПТ-2000	Прогрессия
13	7152	Жен.	15 лет	12.03.2012	Левая лобная доля	Тотальное	НПТ-2000	Ремиссия
14	9779	Жен.	9 лет	29.03.2012	Задняя черепная ямка	Субтотальное	НПТ-2000	Стабилизация
15	17755	Муж.	2 года	19.06.2012	Правая теменная доля	Тотальное	Проводилась лучевая терапия	
16	23649	Муж.	6 лет	13.08.2012	Четвертый желудочек, вращение в ствол и ножки мозжечка	Субтотальное	Проводилась лучевая терапия	
17	1575	Жен.	2 года	15.11.2013	Задняя черепная ямка	Субтотальное	НПТ-2000	Стабилизация
18		Жен.	16 лет	09.12.2013	Четвертый желудочек	Субтотальное	НПТ-2000	Прогрессия

Таблица 1.6

Информация о пациентах с примитивной нейроэктодермальной опухолью, Gr IV (Код ICD-O 9473/3)

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли
1	10979	Муж.	7 лет	20.05.2010	Левая височная доля	Тотальное	CNS High grade	Ремиссия
2	20435	Муж.	10 лет	27.08.2010	Поясничный отдел позвоночника	Тотальное	Euroewing 99	Ремиссия
3	27333	Жен.	6 лет	14.11.2011	Экстрamedулярная опухоль поясничного отдела позвоночника на уровне L1-L4	Тотальное	Euroewing 99	Ремиссия
4	31700	Жен.	1 год	26.12.2011	Правое полушарие головного мозга	Частичное	CNS High grade	Прогрессия
5	14591	Жен.	10 мес.	22.05.2012	Левое полушарие головного мозга	Частичное	CNS High grade	Прогрессия
6	27296	Муж.	16 лет	14.09.2012	Кистозно-солидная опухоль правой височной доли	Тотальное	CNS High grade	Ремиссия

Таблица 1.7

Информация о пациентах с атипичной тератоидной рабдоидной опухолью, Gr IV (Код ICD-O 9508/3)

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли
1	1261	Жен.	5 мес.	22.01.2009	Задняя черепная ямка	Биопсия	Rhabdoid 2007	Прогрессия
2	14651	Жен.	2 года	08.07.2009	Задняя черепная ямка	Частичное	Rhabdoid 2007	Стабилизация
3	14651	Жен.	11 лет	22.09.2009	Четвертый желудочек, поражение ствола головного мозга	Субтотальное	Rhabdoid 2007	Стабилизация
4	5973	Жен.	2 года	11.03.2010	Задняя черепная ямка	Субтотальное	Rhabdoid 2007	Стабилизация
5	5295	Жен.	7 лет	02.03.2011	Задняя черепная ямка	Субтотальное	Rhabdoid 2007	Прогрессия
6	20797	Муж.	2 года	08.09.2011	Лобная доля	Тотальное	Rhabdoid 2007	Прогрессия
7	5827	Жен.	3 года	27.02.2012	Правая теменная доля	Тотальное	Rhabdoid 2007	Прогрессия
8	30192	Муж.	10 мес.	16.10.2012	Полушария мозжечка, метастазирование по полушарию мозжечка (ТЗвМ2)	Субтотальное	Rhabdoid 2007	Прогрессия

Таблица 1.8

Информация о пациентах с нейробластомой, Gr IV (Код ICD-O 9500/3)

№ п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст	Дата операции	Локализация	Радикальность хирургического вмешательства	Протокол химиотерапии	Ответ опухоли на терапию
1	1111	Жен.	5 лет	19.01.2010	Лобно-теменная и височная области	тотальное	NB-2004	ремиссия
2	15460	Муж.	9 лет	06.07.2010	Забрюшинное пространство с интравертебральным ростом на уровне Th9-Th12	частичное	EINS-1999, NB.99.1	стабилизация
3	1958	Муж.	3 года	20.01.2012	Экстрадуральная опухоль на уровне Th5-Th9	частичное	NB-2004	стабилизация
4	29892	Муж.	1 год	02.10.2012	Экстрадуральная опухоль на уровне Th10-L5	тотальное	NB-2004	ремиссия

Примечание: ICD-O – морфологический код по Международной классификации онкологических заболеваний (International Classification of Diseases for Oncology)

Таблица 1.9

Информация о сокропостижно умерших людях, из головного мозга которых была взята нормальная нейроглиальная ткань мозга
(полушария мозжечка)

№ п/п	Номер трупа	Пол	Возраст	Дата смерти	Дата вскрытия	Время после смерти	Причина смерти
1	100	Жен.	50 лет	11.02.2009	12.02.2009	20 ч	Общее переохлаждение организма
2	108	Муж.	66 лет	13.02.2009	14.02.2009	22 ч	Проникающее колото-резаное ранение грудной клетки с повреждением легкого
3	118	Муж.	48 лет	18.02.2009	18.02.2009	16 ч	Цирроз печени
4	121	Муж.	75 лет	21.02.2009	21.02.2009	15 ч	Левожелудочковая недостаточность, перенесенный инфаркт миокарда
5	123	Муж.	67 лет	22.02.2009	23.02.2009	21 ч	Общее переохлаждение организма
6	203	Муж.	52 года	20.03.2009	21.03.2009	22 ч	Общее переохлаждение организма
7	202	Муж.	66 лет	20.03.2009	21.03.2009	24 ч	Левожелудочковая недостаточность, атеросклеротическая болезнь сердца
8	282	Жен.	49 лет	20.04.2009	21.04.2009	20 ч	Утопление
9	286	Муж.	35 лет	22.04.2009	23.04.2009	24 ч	Повешение
10	290	Муж.	60 лет	26.04.2009	26.04.2009	19 ч	Левожелудочковая недостаточность, перенесенный инфаркт миокарда