

Опухолевые стволовые клетки мультиформной глиобластомы

З.Н. Никифорова¹, И.А. Кудрявцев¹, Н.Е. Арноцкая¹, И.С. Брюховецкий^{2,3}, В.Е. Шевченко¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²Школа биомедицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»;
Россия, 690091, Владивосток, ул. Суханова, 8;

³ФГБУН «Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук;
Россия, 690059, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Контакты: Зоя Николаевна Никифорова zojanik@rambler.ru

Мультиформная глиобластома IV степени злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения является наиболее распространенной первичной опухолью головного мозга с медианой выживаемости примерно 15–25 мес после лечения. Опухоль после хирургического лечения часто рецидивирует и резистентна к химио- и лучевой терапии. Мультиформная глиобластома представляет собой высокодифференцированную гетерогенную клеточную популяцию, способную образовывать опухолевые стволовые клетки (ОСК), и подразделяется на 4 молекулярных подтипа: proneйральный, нейральный, классический и мезенхимальный. Несмотря на ряд успехов в изучении механизмов, приводящих к образованию наиболее злокачественных подтипов опухоли, не ясны. **Цель работы** – обобщение современных сведений о роли и биологических особенностях ОСК в опухолевой прогрессии и патогенезе мультиформной глиобластомы.

Способность ОСК к образованию ниши с клетками эндотелия и микроокружением объясняет их основные свойства: пластичность фенотипа, адгезию, выживание и резистентность к стандартному противоопухолевому лечению. Наличие aberrантных сигнальных путей (Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/β-катенин, TGF-β/SMAD, PI3K/Akt/mTOR) как в самой опухоли, так и в популяции ОСК, дисрегуляция микроРНК (miR-21, miR-128, miR-326, miR-34a и др.), влияние эпителиально-мезенхимального перехода объясняют характерные биологические характеристики ОСК. При разработке препаратов, направленных против ОСК, нужно учитывать влияние проводимой терапии и на нормальные стволовые клетки. Найденные за последнее десятилетие регуляторные механизмы и маркеры могут служить основой для создания новых лекарственных препаратов таргетного действия при лечении мультиформных глиобластом.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома, опухолевая стволовая клетка, маркер CD133+, Notch-сигнальный путь, Hedgehog-Gli-сигнальный путь, Wnt/β-катенин-сигнальный путь, TGF-β/SMAD-сигнальный путь, эпителиально-мезенхимальный переход, микроРНК

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-26–33

Tumor stem cells from glioblastoma multiforme

Z.N. Nikiforova¹, I.A. Kudryavtsev¹, N.E. Arnotskaya¹, I.S. Bryukhovetskiy^{2,3}, V.E. Shevchenko¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Biomedicine School, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok, 690091, Russia;

³A.V. Zhirmunskiy Institute of Sea Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences;
17 Pal'chevskogo St., Vladivostok, 690059, Russia

Glioblastoma multiforme, a World Health Organization grade IV malignant glioma, is the most common and lethal primary brain tumor with the median survival of approximately 15–25 months after treatment. Glioblastoma multiforme has been shown to be resistant to radiotherapy and chemotherapy and invariably recurs following surgical resection and chemoradiation. The characteristics of this tumor are exemplified by heterogeneous cell population with diverse biologic properties and genetic changes, the ability to form cancer stem cells (CSC) and divided into four molecular subtypes – proneural, neural, classical and mesenchymal. Despite some success, the mechanisms leading to the formation of the most malignant tumor subtype are unclear. The aim of this review was a synthesis of modern information about the role and biological characteristics of tumor stem cells in tumor progression and the pathogenesis of glioblastoma multiforme. CSCs reside in niches, which are anatomically distinct regions within the tumor microenvironment. These niches maintain the principle properties of CSCs, preserve their phenotypic plasticity, adhesion, survival, resistance to standard cancer treatment and metastatic potential. The presence of aberrant signaling pathways (Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/β-catenin, TGF-β/SMAD, PI3K/Akt/mTOR), both in the tumor and in the population of CSC, the dysregulation of microRNAs (miR-21, miR-128, miR-326, miR-34a), influence of epithelial-to-mesenchymal transition explains the availability of typical biological characteristics of the CSC. One needs to consider the influence of the therapy on normal stem cells in the development of drugs directed against the CSC. Regulatory mechanisms and markers found over the last decade can be used as the basis for creation of the new drugs with targeted action in the treatment of glioblastoma multiforme.

Key words: glioblastoma multiforme, cancer stem cell, CD 133+ marker, Notch-signaling pathway, Hedgehog-Gli-signaling pathway, Wnt/β-catenin-signaling pathway, TGF-β/SMAD-signaling pathway, epithelial – mesenchymal transition, microRNA

Введение

Наиболее распространенная и злокачественная первичная опухоль центральной нервной системы — мультиформная глиобластома, или астроцитомы, IV степени злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения [1]. Мультиформная глиобластома является одной из первых патологий, чей геномный профиль был отражен в проекте TCGA (The Cancer Genome Atlas), она характеризуется гетерогенной клеточной популяцией с различными биологическими свойствами и генетическими изменениями [2, 3]. Выделяют 4 молекулярных подтипа глиобластом: proneurальный, нейтральный, классический и мезенхимальный [1, 3]. Данная опухоль представляет собой гетерогенную клеточную популяцию с различными биологическими свойствами и генетическими изменениями [2]. В настоящее время, несмотря на прогресс в терапии (химио-, лучевая терапия), прогноз для больных глиобластомой — один из самых неблагоприятных в онкологии [3, 4]. Резистентность к противоопухолевому лечению связывают с 1–5 % популяцией клеток, которые называют опухолевые стволовые клетки (ОСК) [1, 4]. Впервые ОСК были обнаружены при остром миелоидном лейкозе. Затем они были выявлены при раке молочной железы и центральной нервной системы. Нейральные стволовые и нейральные прогениторные клетки головного мозга человека рассматриваются большинством исследователей как наиболее вероятный источник возникновения злокачественных глиом [5].

В организме стволовые клетки обнаруживают в нишах, представляющих собой анатомическую субъединицу тканевого компартмента [6]. ОСК активно взаимодействуют с микроокружением ниши, интактными структурами головного мозга и используют их в глиомогенезе. В нишах ОСК подвергаются дифференцировке и образуют гетерогенную популяцию опухолевых клеток. Это объясняет существование популяции клеток с различным опухолевым потенциалом. В нишах обеспечивается самоподдержание и длительное пребывание ОСК в состоянии покоя. Взаимодействие клеток эндотелия и ОСК в нишах обеспечивают сигнальные пути (Notch), факторы роста (VEGF) и микроРНК [7].

Таким образом, ОСК имеют ряд особенностей, понимание которых может иметь большое значение для совершенствования подходов при создании инновационных технологий противоопухолевой терапии злокачественных глиом [8]. Хотя ОСК проходят такие же пути пролиферации и дифференцировки, как и нормальные стволовые клетки, они участвуют в стимуляции канцерогенеза: появляется все больше доказательств того, что они способствуют прогрессии [9] и метастазированию опухоли [10]. Эти клетки вызывают развитие опухоли у иммунокомпрометированных мышей и дифференцируются в клетки, образующие опухоль [11, 12]. ОСК обладают высокой способно-

стью к инвазии, стимулируют образование кровеносных сосудов как внутри опухолевого очага, так и по периферии, выделяют факторы подвижности клеток [6, 13, 14], а также характеризуются наличием резистентности к химио- и радиотерапии из-за гиперэкспрессии генов множественной лекарственной устойчивости.

Молекулярные маркеры опухолевых стволовых клеток мультиформной глиобластомы

ОСК выявляют по способности экспрессировать CD133 — белок клеточной поверхности 120 кДа — известный как проминин 1, который также является маркером нейральных стволовых клеток человека [15, 16]. Помимо CD133 на своей поверхности ОСК экспрессируют CD15, A2B5, молекулы адгезии L1CAM [16], нестин, подоплинин (PDPN) и интегрин альфа 6 (CD49f) [17] (табл. 1). В процессах миграции, инвазии и индукции роста опухоли активное участие принимают металлопротеиназы MMP-2 и MT-1MMP, экспрессирующиеся ОСК глиобластомы.

Нормальная стволовая клетка может трансформироваться в ОСК через нарушение путей пролиферации и дифференцировки, контролируемых ее. В патогенез мультиформной глиобластомы вовлечены гены (*PTEN*, *EGFR*, *p53*, *CDK4*, *CDKN2A/B*, *MDM2*, *MDM4*, *PTEN*, *PDGFR*, *PDGFRA*, *GLI1*, *NF1*, *RB1*, *KIT*, *PI3K*, *PIK3C2B*), регулирующие пролиферацию, апоптоз, клеточный цикл (см. табл. 1) [1, 2]. Один из важнейших онкосупрессоров *PTEN* активно вовлечен в процессы нейрогенеза в мозге взрослого человека [24]. Мутантный белок p53 в стволовых клетках мультиформной глиобластомы аналогичен таковому в нейральных стволовых и прогениторных клетках [25]. Изменения в сигнальном пути p53 включают мутации и делеции из *p53*, гомозиготную делецию *CDKN2A* и амплификации *MDM2* и *MDM4* [1, 26].

Описана комплексная роль генов *p53* и *PTEN* в процессах обновления и дифференцировки в нормальных нейральных и неопластических стволовых клетках [27, 28]. Регуляторы взрослого нейрогенеза *SOX2* и *SOX21* играют ключевую роль в пролиферации неопластических клеток, одновременно их инактивация останавливает рост глиомы *in vivo* [16, 29, 30].

Идентифицированы новые онкогены, участвующие в патогенезе глиобластом, включая *AGAP2/CENTG*, которые являются активаторами PI3K/АКТ/mTOR-сигнального пути [26].

Роль эпителиально-мезенхимального перехода в патогенезе мультиформной глиобластомы

Накапливается все больше доказательств того, что приобретение фенотипа стволовых клеток тесно связано с изменениями, происходящими при эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) [31–38]. При мезенхимальном подтипе мультиформной глиобластомы, как правило, экспрессируются маркеры стволовых

Таблица 1. Маркеры стволовых клеток при мультиформной глиобластоме [по 1, 17–23]

Маркер	Тип	Связь с канцерогенезом
CD133	Гликопротеин	Ассоциирован с более агрессивными типами опухоли
L1CAM (CD171)	Маркер клеточной адгезии	Необходим для поддержания роста и выживания CD133+ ОСК
CD44	Маркер клеточной поверхности	Ассоциирован с более агрессивными типами опухоли, локализуется вместе с Id1 в нишах эндотелиальных стволовых клетках
CD34	Мембранный белок, маркер межклеточной адгезии	Идентифицирован в митотически активных клетках большинства видов глиом CD34, опосредует связывание стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или напрямую со стромальными клетками
A2B5	Гликозид клеточной поверхности	Противоречивые данные о связи с более агрессивными типами глиобластомы
ID1	Фактор транскрипции	Участие в самообновлении опухолевых стволовых клеток
CD15 (aka-SSEA-1 или LeX)	Белок клеточной поверхности	Маркер стволовых клеток в опухолях негативных по CD133
Нестин	Белок клеточной поверхности	Служит важным идентификатором всех типов стволовых клеток
<i>Nanog</i>	Фактор транскрипции	Модуляция сферообразования, контроль пролиферации, инвазии
<i>Oct4</i>	Фактор транскрипции	Инвазия
<i>SOX2</i>	Фактор транскрипции	Один из маркеров пронеурального субтипа глиобластом. Образование нейросфер, инвазия
Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	Фактор роста	Ангиогенез, канцерогенез. Экспрессия увеличивается в условиях гипоксии через активацию HIF-пути. Неблагоприятный прогноз у пациентов
stromal-derived factor-1 (SDF1)	Хемокин	Обуславливает фенотип глиобластомы с инвазивными свойствами, стимуляция ангиогенеза в превазкулярных нишах. Пролиферации через паракринные системы. Образуется в условиях гипоксии при активации PI3K/Akt- и ERK1/2-сигнальных путей
Интегрин альфа 6 (CD49f)	Гликопротеин из надсемейства интегринов	Формирование межклеточных связей, маркер превазкулярных ниш, участвует в прогрессии заболевания
Подопланин (PDPN)	Трансмембранный гликопротеин	Инвазия
Интегрин 6	Трансмембранный рецептор	Регуляция самообновления, пролиферации и образования опухоли при взаимодействии с внеклеточным матриксом

клеток, связанные с агрессивным фенотипом опухоли (CD44) [31]. По сравнению с пронеуральным, мезенхимальный подтип заболевания характеризуется неблагоприятным прогнозом и формированием резистентности к стандартной химиолучевой терапии. Подробно описано, что ЭМП играет важную роль в преобразовании как нормальных, так и опухолевых эпителиальных клеток в производные с фенотипом наподобие мезенхимальному [35]. В результате ЭМП клетки приобретает свойства, присущие низкокодифференцированным опухолям, включая подвижность, способность к инвазии и повышение устойчивости к апоптозу, связанные с метастазированием и прогрессированием опухоли [36]. ЭМП регулируется факторами транскрипции *SNAIL*, *TWIST* и *ZEB*, дисрегуляция которых связана с опухолевой инвазией и плохим клиническим прогнозом при мультиформной глиобластоме (табл. 2) [25, 31, 34, 39]. *SNAIL*, *TWIST* и *ZEB* подав-

ляют экспрессию E-кадгерина, замещая его маркерами мезенхимального фенотипа (N-кадгерин, виментин). Таким образом, экспрессия маркеров мезенхимального фенотипа мультиформной глиобластомы связана с наиболее неблагоприятным прогнозом у пациентов и развитием резистентности к стандартной терапии [31].

Нейральные стволовые клетки и ОСК используют для поддержания и выживания одни и те же сигнальные пути: Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR, MAPK и STAT3, которые взаимосвязаны между собой и могут способствовать развитию лекарственной резистентности и рецидивированию мультиформной глиобластомы. Важную роль в этом процессе играет трансформирующий фактор роста β 1 (TGF- β 1) – один из основных регуляторов 3-го типа (инвазивного) ЭМП [37]. Известно, что TGF- β 1 активирует сигнальные пути, участвующие в ЭМП, в частности сигнальный путь TGF- β /SMAD [38].

Таблица 2. Молекулярные маркеры эпителиально-мезенхимального перехода, участвующие в патогенезе мультиформной глиобластомы [по 25, 31, 34, 39]

Ген, фактор транскрипции, белок эпителиально-мезенхимального перехода	Функция	Роль в патогенезе мультиформной глиобластомы
<i>TWIST</i>	Фактор, ускоряющий ЭМП	Усиление инвазии
CD29, CD44, CD90, CD105	MSC-белки	Сверхэкспрессия в клеточных линиях глиобластом
<i>YKL-40</i> , <i>TNC</i> , остеонектин <i>STAT3</i>	Регуляция ЭМП	Инфильтрация и опухолевый рост
<i>TAGLN2</i> , <i>IGFBP2</i> , <i>IGFBP3</i> , <i>POSTN</i> , <i>TNC</i> , TGF- β 1	Маркеры ЭМП при раке молочной железы	Предикторы прогноза заболевания
<i>SNAI1</i>	Промоция ЭМП	Высоко экспрессирован при глиомах. При прогрессировании заболевания экспрессия увеличивается. Пролиферация клеток и инфильтрирующий рост опухоли
<i>SIP1</i>	Индуктор ЭМП	Инвазия, образование клонов
<i>CXCR4</i>	MSC-маркер	Усиление миграции. Влияет на экспрессию маркеров ЭМП
<i>ZEB2</i>	Фактор транскрипции	Экспрессия повышена, корреляция с гистологической градацией глиобластомы

Сигнальный путь TGF- β /SMAD, включающий 8 факторов транскрипции, вовлечен в развитие и прогрессирование опухолей головного мозга [40]. Основной регулятор инвазивной фазы ЭМП TGF- β 1 связывается с рецепторами I и II типа, которые, в свою очередь, фосфорилируют рецептор-регулируемые сигнальные белки SMAD (r-SMADs), SMAD2 и SMAD3 [41], соединяющиеся со SMAD4. Такой комплекс белков транслоцируется в ядро клетки [41], где они регулируют экспрессию специфичных генов через связывание участков промоторов. Известно, что SMAD2 является медиатором клеточного сигнала от TGF- β и регулирует множество клеточных процессов (клеточная пролиферация, апоптоз, дифференциация клеток).

Исследования последних лет подтверждают ключевую роль TGF- β 1 как фактора роста ОСК глиобластом [37, 42]. Экспрессия этого белка в злокачественных глиомах увеличена [40]. Предполагается, что TGF- β 1 обеспечивает сигналинг в нишах ОСК. TGF- β 1-рецепторы локализованы в межклеточных контактах и усиливают синтез белков межклеточного матрикса [40]. Под действием секретируемого TGF- β 1 ОСК образуют ниши с клетками эндотелия через SDF-1/CXCR4-зависимый путь [21, 29], а также дифференцируются в клетки, напоминающие перициты и, обеспечивающие периваскулярную нишу питанием [7].

TGF- β 1 влияет на свойства ОСК через 2 независимых пути: TGF- β –LIF, через который уменьшается экспрессия E-кадгерина, и TGF- β –SOX4–SOX2. Известно, что TGF- β 1 оказывает влияние на таргетные гены через SMAD-независимые пути, такие как RAS, MAPK, PI3K, Notch, Wnt.

Также известно, что TGF- β 1 индуцирует ЭМП, миграцию клеток и метастазирование. Ингибиторы TGF- β 1 влияют на образование сфер глиобластомы в условиях *in vitro* и на размеры опухоли в условиях *in vivo*, воздей-

ствуют на количественный состав популяции клеток, положительных по нестину и CD133+ [40].

Сигнальный путь Notch хорошо известен как регулятор специфической дифференцировки, пролиферации, жизнеспособности и миграционной активности клеток. Его роль в контроле пролиферации и дифференцировки стволовых клеток продемонстрирована для нескольких типов клеток, включая гемопоэтические и нейральные стволовые клетки. Трансмембранные белки Notch-зависимого пути действуют в опухолях как онкогены. Аберрантная активация сигнального пути Notch была обнаружена и при глиобластоме [15]. Показана связь ОСК с сигнальным путем Notch: ингибирование этого каскада белков приводило к снижению образования нейросфер [43]. Кроме того, сверхэкспрессия *Notch* в мышинной модели *K-ras*-индуцированной глиобластомы приводила к увеличению уровня нестина, а также вызывала образование опухоли в субэпендимальной зоне головного мозга. Сигнальный путь связан с резистентностью ОСК при радиационной терапии [44].

X. Fan и соавт. показали, что блокирование этого сигнального пути ингибитором γ -секретазы снижает количество CD133+ ОСК мультиформной глиобластомы [45]. Ингибиторы γ -секретазы проходят 1-е этапы клинических испытаний. DNER (Delta/Notch-like epidermal growth factor-related receptor) и DLL4 (Notch ligand Delta-like 4) также вовлечены в регуляцию опухолевого роста глиобластом. Терапия, направленная на подавление экспрессии *DLL4*, показала положительный эффект, но продолжительное ингибирование *DLL4* вызывает рост опухоли. Регуляторы сигналинга ID4 (ингибитор дифференциации 4) и CXCR4 задействованы в сигнальном пути Notch при патогенезе опухолей головного мозга. Тем не менее их роль в ОСК глиобластомы до конца не ясна [37].

Сигнальный путь Wnt — внутриклеточный сигнальный путь, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей. Через этот сигнальный путь регулируется самообновление стволовых клеток и индукция ЭМП опухолевых клеток. Сверхэкспрессия лигандов Wnt или супрессия эндогенных ингибиторов Wnt наблюдается при многих типах рака человека, в том числе при раке толстой кишки, молочной железы, глиобластоме; в последнем случае — связана с активацией ЭМП [46]. Активация сигнального пути Wnt инициируется связыванием лигандов Wnt (обычно Wnt1 или Wnt3a) с рецепторами клеточной поверхности, состоящих из Frizzled (Fzd), LDL и рецепторсвязанных белков LRP5 или LRP6.

Активация Wnt приводит к ингибированию GSK-3 β , стабилизации и транслокации в ядро β -катенина, который образует комплекс с факторами транскрипции TCF/LEF и регулирует транскрипцию генов-мишеней Wnt [47]. Переход β -катенина в ядро приводит к снижению экспрессии E-кадгерина и сопровождается прогрессированием опухолевого заболевания под влиянием метастазов, что связано с приобретением опухолью мезенхимального фенотипа при многих солидных новообразованиях [35, 48]. Большинство мультиформных глиобластом не экспрессируют E-кадгерин, тем не менее при инвазивных формах β -катенин находят в ядре. Известно, что β -катенин предложен в качестве прогностического маркера при глиобластоме и астроцитомах, так как уровни его матричной РНК (мРНК) и белка были увеличены и коррелируют со степенью злокачественности [35].

Активированный β -катенин участвует в канцерогенезе и приводит к усиленному самообновлению стволовых клеток и пролиферации. Несколько протоонкогенов способствуют росту глиобластомы и увеличению популяции ОСК через активацию TCF-4, компонента сигнального пути Wnt. В качестве регуляторов сигнального пути Wnt исследуют ингибиторы его компонентов и их рецепторов. Инициацию сигналинга Wnt предотвращают DKK1–4 и WIF1 за счет нарушения взаимодействия лигандов Wnt и Fzd-рецепторов и корецепторов LRP5–6. Обработка клеток глиобластомы белком secreted frizzled-related protein 4 (sFRP4) модулирует ЭМП через сигнальный путь Wnt/ β -катенин и активирует уровни экспрессии SNAIL, способствуя приобретению мезенхимального фенотипа при глиобластомах [46]. GSK-3 β регулирует стабильность и активность β -катенина и других факторов транскрипции, связанных с ЭМП, таких как SNAIL1 [49]. Этот сигнальный путь также вовлечен в формирование резистентности при терапии глиобластомы. Результаты последних исследований могут использоваться для разработки новых подходов при химиотерапевтическом лечении мультиформной глиобластомы.

Сигнальный путь Sonic Hedgehog (SHH) включает в себя семейство секретируемых белков, играющих ключевую роль в морфогенезе органов и тканей. Hed-

gehog-сигнальный путь регулирует тканевую полярность и популяцию стволовых клеток [39]. Транскрипционные факторы *Gli*, которые регулируются SHH, берут свое название от глиом, где они обычно экспрессируются. В мозге SHH-сигналинг отвечает за поддержание ниш для нейтральных стволовых клеток в нейрогенных областях. *Gli* оказывают активное влияние на процессы химиорезистентности. На моделях мышей была показана корреляция активности *Gli* с градацией мультиформных глиобластом [29]. Несколько научных групп исследовали роль Hedgehog-Gli в регуляции сигналинга ОСК и обнаружили, что этот сигнальный путь регулирует самообновление и образование ОСК в опухоли [16, 17, 29]. Между сигнальными путями SHH и Wnt существует взаимосвязь. Они оба обычно гиперактивируются в опухолях и поддерживают опухолевый рост, участвуют в корегуляции нейтральных стволовых клеток. Факторы транскрипции *Gli* участвуют в регуляции ЭМП через гены *SNAIL1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST2* [50] и *FOXC2*. *Gli1* способствует передаче β -катенина в ядро через *SNAIL1* и E-кадгерин [51].

В настоящее время доступны фармакологические ингибиторы SHH-пути, такие как циклопамин и его растворимый аналог. Циклопамин подавляет пролиферацию и клоногенную способность клеток глиобластомы, что приводит к снижению экспрессии транскрипционных факторов *Nanog*, *SOX2* и *Oct4*. Кроме того, лечение циклопамином улучшает эффективность лучевой терапии [39]. Таким образом, ингибиторы SHH-сигнального пути могут улучшать эффективность традиционной терапии мультиформной глиобластомы. Тем не менее необходимо оценивать влияние этих ингибиторов на нормальные стволовые клетки. В клинических исследованиях с Hedgehog-ингибитором GDC-0449 [52] были получены хорошие результаты с низкой токсичностью у больных медуллобластомой головного мозга.

Регуляторные функции микроРНК

МикроРНК представляют собой класс некодирующих РНК, состоящих из 22 нуклеотидов и играющих важную роль в регуляции генов-мишеней. Согласно современным представлениям количество микроРНК составляет ~1 % от генома высших эукариот и регулирует 10–30 % генов [53–63].

МикроРНК обуславливают процессы пролиферации, миграции, инвазии различных типов опухолей, включая мультиформную глиобластому [54]. На данный момент известно о 95 микроРНК с пониженной и о 255 с повышенной экспрессией при множественной глиобластоме [55]. В других исследованиях выявлены 43 aberrантных микроРНК (miR-21, miR-128, miR-326, miR-34a), экспрессирующихся в глиомах и связанных с пролиферацией, инвазией ОСК глиобластом [55–63]. Так, при гиперэкспрессии miR-128 поддерживается образование нейросфер в культуре клеток [56].

Известно, что микроРНК осуществляют регуляцию трансляционной эффективности мРНК или скорости деградации мРНК за счет комплементарного связывания с мишенью. МикроРНК влияют напрямую на онкогенез или через сигнальные пути Notch (miR-146a) и TGF- β /SMAD (miR-18a, miR-21, miR-451), через которые модулируется миграция, пролиферация, инвазия и ответ на химиотерапевтическое лечение при мультиформной глиобластоме. Кроме того, микроРНК влияют на экспрессию эпидермального и тромбоцитарного факторов роста (PDGF, EGFR) и *P TEN*, которые вовлечены в патогенез глиобластомы.

Экспрессия онкогенной miR-21 при мультиформной глиобластоме повышена. Ее регуляция связана с сигнальными путями TGF- β /SMAD и p53. На моделях клеточных линий показано ее негативное влияние на экспрессию опухолевых супрессоров, включая p53, Bax, DAXX, ARAF1, p21, TAp63 и TGFBR2 [55]. Она регулирует экспрессию MMP-2, коэкспрессируется с *SOX2*, способствуя инвазии и ангиогенезу, ее высокие уровни связаны с плохой выживаемостью пациентов. [31]. Аналогичным образом при избыточной экспрессии miR-21 наблюдали снижение маркеров нейральных стволовых клеток – нестина, *TUJ1* – и повышение экспрессии маркера астроцитов *GFAP*. Показана роль miR-21 в поддержании стволовости клеток [57]. Подавление miR-21 приводит к заметному увеличению экспрессии *P TEN*. Кроме того, трансфекция с антисмысловой miR-21 приводит к значительному повышению чувствительности клеточных линий U-251, U87MG к радиационной и химиотерапии [58].

В ОСК онкогенные miR-221/222 гиперэкспрессированы, что ассоциируется с активацией факторов транскрипции NF- κ B и c-Jun. Их гиперэкспрессия вызывает снижение образования коннексина 43 (GJA1), основного компонента щелевых контактов, что влияет на пролиферацию и инвазию. И наоборот, ингибирование miR-221/222 усиливает экспрессию нестина [57].

Восстановление функционирования miR-153 в ОСК глиобластомы приводит к дифференцировке ОСК.

Опухолевые супрессоры, такие как miR-7, miR-23b, miR-34a, miR-101, miR-124a, miR-137, miR-146b, miR-195, miR-302/367 и miR-410, предотвращают инвазию и пролиферацию ОСК при глиобластоме [31]. Амплификация *EGFR* и делеция miR-34 связаны с укороченным

периодом продолжительности жизни у больных мультиформной глиобластомой [59]. Трансфекция miR-34a в ОСК приводит к снижению пролиферации и выживаемости клеток, миграции, а также к уменьшению экспрессии CD133 и нестина [60, 61]; miR-137 также ингибирует самообновление и дифференцировку ОСК глиобластомы через снижение уровней *Oct4*, *Nanog* и *SOX2* [62]. Гиперэкспрессия miR-128a, miR-504, miR-124a и miR-184 коррелирует с уменьшением мезенхимальных маркеров при множественной глиобластоме, что влияет на более благоприятный прогноз у пациентов [63].

Эти данные подчеркивают особую роль микроРНК в патогенезе мультиформной глиобластомы, а также их прогностическое значение. Большое значение имеет разработка диагностических наборов известных абберрантных микроРНК в диагностике мультиформной глиобластомы.

Заключение

В настоящее время большое значение в патогенезе мультиформной глиобластомы придают ОСК. Их способность к самоподдержанию, адгезии, выживанию, резистентности к стандартному противоопухолевому лечению зачастую обусловлена возможностью образовывать и поддерживать ниши с характерным микроокружением и васкуляризацией. Измененные сигнальные пути (Notch, Hedgehog-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β /SMAD, PI3K/Akt/mTOR) и экспрессия молекулярных маркеров (CD49f, SDF1, VEGF, CD44, CD34) направлены на поддержание существования ниш ОСК мультиформной глиобластомы. Большое значение приобретает разработка более эффективных методов лечения для преодоления химио- и лучевой резистентности ингибиторами сигнальных путей, а также модуляцией микроРНК. Ингибиторы γ -секретазы и SHH-сигнального пути (циклопамин, GDC-0449) исследованы и в настоящее время проходят 1-е этапы клинических испытаний. Важно отметить, что при разработке препаратов, направленных против ОСК, нужно учитывать влияние проводимой терапии на нормальные стволовые клетки. Дальнейшие исследования необходимы для улучшения понимания роли ОСК в опухолеобразовании и для разработки новых подходов к терапии мультиформной глиобластомы с участием препаратов, направленных против ОСК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Jhanwar-Uniyal M., Labagnara M., Friedman M. et al. Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers (Basel)* 2015;7(2):538–55.
2. Morokoff A., Ng W., Gogos A., Kaye A.H. Molecular subtypes, stem cells

- and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clin Neurosci* 2015;22(8):1219–26.
3. Wang X., Venugopal C., Singh S.K. Cancer stem cells in brain cancer. In: *Cancer stem cells in solid tumors*. Ed. by Alison L. Allan.

- Springer Science, Business Media, 2011. Pp. 37–57. P. 465.
4. Inda M.M., Bonavia R., Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers (Basel)* 2014;6(1):226–39.

5. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396–401.
6. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414(6859):105–11.
7. Safa A.R., Saadat-zadeh M.R. Cohen-Gadol A.A. et al. Emerging targets for glioblastoma stem cell therapy. *J Biomed Res* 2016;30(1):19–31.
8. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Кумейко В.В. и др. Стволовые клетки в канцерогенезе мультиформной глиобластомы. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013;8(2):13–9. [Bryukhovetskiy I.S., Bryukhovetskiy A. S., Kumeyko V.V. et al. Stem cells in the cancerogenesis of the multiform glioblastoma. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya = Cell Transplantation and Tissue Engineering* 2013;8(2):13–9. (In Russ.)].
9. Dalerba P., Cho R.W., Clarke M.F. Cancer stem cells: models and concepts. *Ann Rev Med* 2007;58:267–84.
10. Wicha M.S. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds. *Clin Cancer Res* 2006;12(19):5606–7.
11. Jordan C.T., Guzman M.L., Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006;355(12):1253–61.
12. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. et al. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;66(19):9339–44.
13. Safa A.R., Saadat-zadeh M.R., Cohen-Gadol A.A. et al. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis* 2015;2(2):152–63.
14. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011;17(3):313–9.
15. Vescovi A.L., Galli R., Reynolds B.A. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6(6):425–36.
16. Huang Z., Cheng L., Guryanova O.A. et al. Cancer stem cells in glioblastoma – molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* 2010;1(7):638–55.
17. Candace A. Gilbert, Alonzo H. Ross. Glioma stem cells: cell culture, markers and targets for new combination therapies. In: *Cancer stem cells theories and practice*. Ed. by S. Shostak. 2011. P. 80.
18. Kalkan R. Glioblastoma stem cells as a new therapeutic target for glioblastoma. *Clin Med Insights Oncol* 2015;9: 95–103.
19. Zbinden M., Duquet A., Lorente-Trigos A. et al. Nanog regulates glioma stem cells and is essential *in vivo* acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J* 2010;29(15):2659–74.
20. Wang S.C., Hong J.H., Hsueh C., Chiang C.S. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab Invest* 2012;92(1):151–62.
21. Xu C., Wu X., Zhu J. VEGF promotes proliferation of human glioblastoma multiforme stem-like cells through VEGF receptor 2. *Scientific World Journal* 2013;2013:1–8.
22. Berezovsky A.D., Poisson L.M., Cherba D. et al. SOX2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia* 2014;16(3):193–206.
23. Islam F., Gopalan V., Smith R.A., Lam A.K. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res* 2015;335(1):135–47.
24. Omari K.M., Dorovini-Zis K. CD40 expressed by human brain endothelial cells regulates CD34+ T-cell adhesion to endothelium. *J Neuroimmunol* 2003;134(1–2):166–78.
25. Wang Y., Yang J., Zheng H. et al. Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytes glioma in a murine model. *Cancer Cell* 2009;15(6):514–26.
26. Cerami E., Demir E., Schultz N. et al. Automated network analysis identifies core pathways in glioblastoma. *PLoS One* 2010;5(2):e8918.
27. Zheng H., Ying H., Yan H. et al. P53 and PTEN control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 2008;455(7216):1129–33.
28. Holland E.C., Celestino J., Dai C. et al. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature Genet* 2000;25(1):55–7.
29. Schonberg D.L., Lubelski D., Miller T.E., Rich J.N. Brain tumor stem cells: molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol Aspects Med* 2014;39:82–101.
30. Annovazzi L., Mellai M., Caldera V. et al. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 2011;8(3):139–47.
31. Ortensi B., Setti M., Osti D., Pellicci G. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther* 2013;4(1):18.
32. Hugo H., Ackland M.L., Blick T. et al. Epithelial – mesenchymal and mesenchymal – epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007;213(2):374–83.
33. Kahlert U.D., Nikkha G., Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett* 2013;331(2):131–8.
34. Lee J.K., Joo K.M., Lee J. et al. Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. *Oncotargets Ther* 2014;7:1933–44.
35. Iwade Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* 2016;11(3):1615–20.
36. Nakada M., Kita D., Watanabe T. et al. Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers (Basel)* 2011;3(3):3242–78.
37. Ikushima H., Todo T., Ino Y. et al. Autocrine TGF- β signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009;5(5):504–14.
38. Heldin C.H., Landström M., Moustakas A. Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(2):166–76.
39. Merchant A.A., Matsui W. Targeting Hedgehog – a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010;16(12):3130–40.
40. Ikushima H., Miyazono K. TGF- β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2010;10(6):415–24.
41. Ross S., Hill C.S. How the SMADs regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(3):383–408.
42. Peñuelas S., Anido J., Prieto-Sánchez R.M. et al. TGF- β increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2009;15(4):315–27.
43. Kristoffersen K., Villingshoj M., Poulsen H.S., Stockhausen M.T. Level of NOTCH activation determines the effect on growth and stem cell-like features in glioblastoma multiforme neurosphere cultures. *Cancer Biol Ther* 2013;14(7):625–37.
44. Stockhausen M.T., Kristoffersen K., Poulsen H.S. NOTCH signaling and brain tumors. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:289–304.
45. Fan X., Khaki L., Zhu T.S. et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* 2010;28(1):5–16.
46. Bhuvanlakshmi G., Arfuso F., Millward M. et al. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits glioma stem-like cells by reversing epithelial to mesenchymal transition, inducing apoptosis and decreasing cancer stem cell properties. *PLoS One* 2015;10(6):e0127517.
47. Cadigan K.M., Peifer M. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1(2):a002881.
48. Wu Y., Zhou B.P. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008;40(7):643–50.
49. Zhou B.P., Deng J., Xia W. et al. Dual regulation of SNAIL by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control

- of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004;6(10):931–40.
50. Li X., Deng W., Nail C.D. et al. SNAIL induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 2006;25(4):609–21.
51. Li X., Deng W., Lobo-Ruppert S.M., Ruppert J.M. Gli1 acts through SNAIL and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin. *Oncogene* 2007;26(31):4489–98.
52. Rudin C.M., Hann C.L., Laterra J. et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 2009;361(12):1173–8.
53. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
54. Huse J.T., Holland E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10(5):319–31.
55. Brower J.V., Clark P.A., Lyon W., Kuo J.S. MicroRNAs in cancer: glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells. *Neurochem Int* 2014;77:68–77.
56. Godlewski J., Nowicki M.O., Bronisz A. et al. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 2008;68(22):9125–30.
57. Aldaz B., Sagardoy A., Nogueira L. et al. Involvement of miRNAs in the differentiation of human glioblastoma multiforme stem-like cells. *PLoS One* 2013;8(10):e77098.
58. Moller H.G., Rasmussen A.P., Andersen H.H. et al. A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiol* 2013;47(1):131–44.
59. Yin D., Ogawa S., Kawamata N. et al. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2013;32(9):1155–63.
60. Guessous F., Zhang Y., Kofman A. et al. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle* 2010;9(6):1031–6.
61. Li Y., Guessous F., Zhang Y. et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res* 2009;69(19):7569–76.
62. Bier A., Giladi N., Kronfeld N. MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1. *Oncotarget* 2013;4(5):665–76.
63. Ma X., Yoshimoto K., Guan Y. et al. Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma. *Neuro Oncology* 2012;14(9):1153–62.