

# Репарация ДНК в опухолевых стволовых клетках как фактор развития устойчивости глиом к радиотерапии

Ю.С. Макушева<sup>1</sup>, Г.Л. Дианов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Оксфордский институт радиационной онкологии, Отделение онкологии Оксфордского университета, Оксфорд, Великобритания

Глиомы – опухоли головного мозга, происходящие из клеток глии и их предшественников. Несмотря на применяемые методы лечения, выживаемость пациентов остается крайне низкой. Высокая смертность больных связана с устойчивостью этих опухолей к терапии, в большинстве случаев даже после хирургического удаления опухоли и последующего лечения сохраняется высокая вероятность рецидива заболевания. В настоящее время развитие глиом связывают с так называемыми опухолевыми стволовыми (ОСК), или опухоль-иницирующими, клетками. Широкое распространение получила иерархическая модель структурной организации опухоли, при которой вся опухоль развивается из одной клетки. Такие клетки, обладающие характеристиками стволовых клеток, за счет способности к самообновлению и дифференцировке, а также наличия генетических нарушений обеспечивают развитие опухоли. Таким образом, даже наличие небольшого числа таких клеток после удаления основной массы опухоли может привести к повторному развитию злокачественной опухоли. Накопленные за последнее время данные свидетельствуют о важной роли ОСК в развитии устойчивости опухоли к действию химио- и радиотерапии. В данном обзоре помимо общей информации о классификации глиом и методах лечения этих опухолей также рассматриваются результаты исследований, связанных именно с влиянием лучевой терапии на жизнеспособность ОСК, а также с определением роли процесса репарации ДНК в восстановлении опухолевых стволовых клеток. Можно сделать вывод, что процесс репарации ДНК вносит значимый вклад в развитие устойчивости ОСК к действию ионизирующего излучения. Также получены данные, свидетельствующие о том, что ингибирование репарации в таких клетках приводит к увеличению чувствительности опухоли к радиотерапии.

Ключевые слова: глиома; репарация ДНК; радиотерапия; опухолевые стволовые клетки.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Макушева Ю.С., Дианов Г.Л. Репарация ДНК в опухолевых стволовых клетках как фактор развития устойчивости глиом к радиотерапии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):247-254. DOI 10.18699/VJ15.031

## HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Makusheva Yu.S., Dianov G.L. DNA repair in cancer stem cells as a factor for glioma resistance to radiotherapy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):247-254. DOI 10.18699/VJ15.031

DOI 10.18699/VJ15.031

УДК 615.8:602.9:577.29

Поступила в редакцию 05.02.2015 г.

Принята к публикации 28.05.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: makusheva@bionet.nsc.ru

## DNA repair in cancer stem cells as a factor for glioma resistance to radiotherapy

Yu.S. Makusheva<sup>1</sup>, G.L. Dianov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Cancer Research UK and Medical Research Council Oxford Institute for Radiation Oncology, Department of Oncology, University of Oxford, Oxford, UK

Gliomas are brain tumors originating from glial cells and their precursor cells. In spite of currently used therapy, patient survival remains very poor. The main reason for dismal prognosis is the high level of tumor recurrence because of resistance to different ways of treatment. Currently, it is believed that glioma development is connected with the existence of cancer stem cells (CSCs), or tumor-initiating cells. The theory of hierarchal tumor structure is now commonly accepted. It accounts for characteristics of these cells, namely, the capability of self-renewal and differentiation into astrocytes, oligodendrocytes, and neurons. Moreover, these cells bear multiple genetic lesions typical of cancer cells. Thus, the presence of these cells after surgery and further treatment allows the tumor to recur. The data obtained in recent years confirm the important role of CSCs in the development of tumor resistance to chemo- and radiotherapy. In this review, we present general information about classification and treatment of gliomas and consider results of research connected with the influence of radiation therapy. Some authors show that DNA repair enables CSCs to survive even after treatment. To sum up, it is shown that DNA repair contributes to the development of tumor resistance to ionizing radiation. In addition, our work confirms the hypothesis that inhibition of DNA repair processes in these cells leads to tumor sensitization to radiotherapy.

Key words: glioma; DNA repair; radiotherapy; cancer stem cells.

Опухоли головного мозга – исключительно гетерогенная группа новообразований, различающихся по молекулярно-биологическим и гистологическим характеристикам и, как следствие, по основным подходам при их лечении. Среди первичных опухолей головного мозга взрослых людей более 30 % составляют глиомы – опухоли, происходящие из глиальных клеток (астроглиальных и/или олигодендроглиальных), которые в зависимости от происхождения и степени анаплазии делятся на несколько типов и градаций. Наиболее агрессивными и практически не поддающимися лечению являются глиобластомы (IV степень злокачественности), которые составляют примерно половину от всех выявляемых глиом.

Концепция иерархической структуры опухоли с ОСК как предшественниками всех клеток была впервые показана на гематологических онкологических заболеваниях, но затем подтверждена и для солидных опухолей, в том числе глиом (Singh et al., 2004; Zaidi et al., 2009; Heywood et al., 2012). Известно, что по крайней мере в некоторых типах опухолей небольшая популяция раковых стволовых клеток может определять биологическое поведение опухоли, включая ответ на терапию (Tamura et al., 2010). Несмотря на существующие методы лечения, включающие хирургическое удаление опухоли и последующую химио- и радиотерапию, прогноз для пациентов остается крайне неблагоприятным. Так как глиомы являются диффузными опухолями и во время операции невозможно удалить все опухолевые клетки, то даже после применения высоких доз облучения сохраняется высокая вероятность рецидива опухоли (Heywood et al., 2012).

В исследовании ряда авторов было показано увеличение количества ОСК после облучения за счет более эффективной репарации повреждений ДНК этих клеток по сравнению с клетками опухоли, не обладающими характеристиками стволовых (Bao et al., 2006; Tamura et al., 2010; Lim et al., 2012). Однако также имеются данные, свидетельствующие о большей чувствительности ОСК к действию ионизирующего излучения (McCord et al., 2009), и, таким образом, необходимо дальнейшее изучение роли ОСК в возникновении устойчивости глиом к радиотерапии. В данном обзоре представлены результаты исследований процессов репарации ДНК опухолевых стволовых клеток, а также рассмотрена роль этих процессов в развитии устойчивости глиом к действию ионизирующего излучения.

### Классификация глиом

Глиомы – наиболее часто встречающиеся первичные опухоли головного мозга, имеющие нейроэктодермальное происхождение. По разным оценкам они составляют от 50 до 80 % всех злокачественных новообразований центральной нервной системы и значительно различаются по морфологии, локализации, генетическим изменениям и ответу на терапию.

Согласно существующей в настоящее время классификации Всемирной организации здравоохранения в зависимости от исходного типа клеток глиомы делят на три типа:

1. Астроцитарные опухоли (астроциты и их предшественники).

2. Олигодендроглиальные опухоли (олигодендроциты и их предшественники).

3. Олигоастроцитарные опухоли (смешанный тип).

По степени злокачественности выделяют четыре градации:

I. Субэпендимарные гигантоклеточные астроцитомы и пилоцитарные астроцитомы.

II. Пиломиксоидные астроцитомы, диффузные астроцитомы, плеоморфные ксантоастроцитомы, олигодендроглиомы и олигоастроцитомы.

III. Анапластические астроцитомы, олигодендроглиомы и олигоастроцитомы.

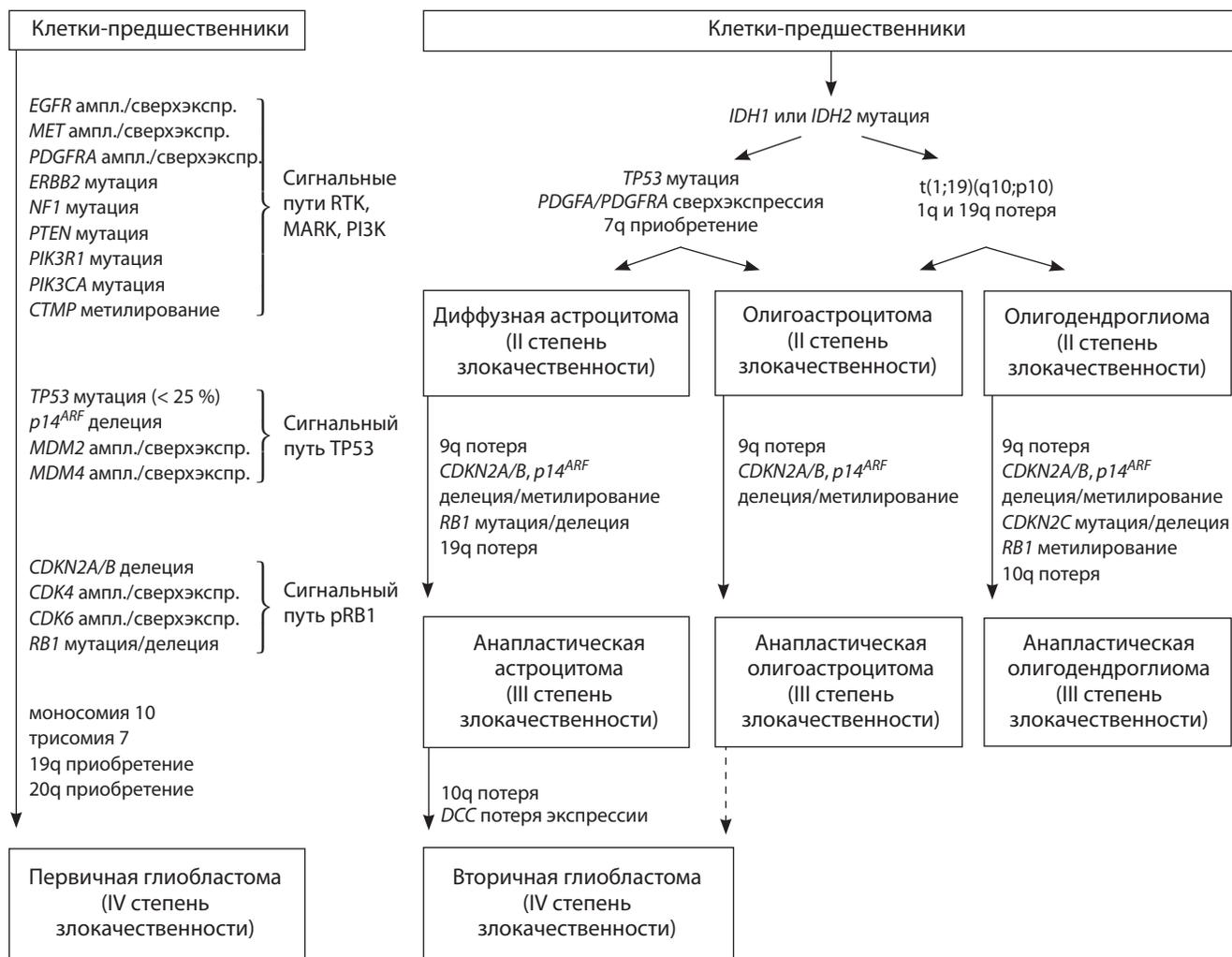
IV. Глиобластомы – гигантоклеточные глиобластомы и глиосаркомы.

Астроцитомы второй степени злокачественности (II степень злокачественности) – это хорошо дифференцированные и медленно растущие опухоли, главной негативной характеристикой которых является способность диффузно проникать в окружающие структуры мозга. Вследствие этого такие опухоли имеют тенденцию возникать снова после хирургического удаления, что часто приводит к прогрессии в более злокачественные типы, такие как анапластическая астроцитома (III степень злокачественности) и в конечном итоге вторичная глиобластома (IV степень злокачественности) (Louis et al., 2007).

Олигодендроглиомы второй степени злокачественности – это также хорошо дифференцированные, медленно растущие и диффузно распространяющиеся опухоли, обычно расположенные в полушариях головного мозга и состоящие преимущественно из клеток, морфологически схожих с клетками олигодендроглии. Анапластическая олигодендроглиома (III степень злокачественности) – олигодендроглиома с различными гистологическими характеристиками злокачественности и менее благоприятным прогнозом (Louis et al., 2007).

Олигоастроцитомы второй степени злокачественности состоят из двух различных типов опухолевых клеток, морфологически похожих на опухолевые клетки олигодендроглиомы и астроцитомы низкой степени злокачественности (Louis et al., 2007). Анапластическая олигоастроцитома (III степень злокачественности) – это олигоастроцитома с гистологическими признаками злокачественности, которая по генетическому статусу и выживаемости является промежуточным типом между анапластическими астроцитомами и олигодендроглиомами (Okamoto et al., 2004; Louis et al., 2007).

Глиобластомы (IV степень злокачественности) встречаются наиболее часто и являются самыми агрессивными глиомами. Подавляющее большинство глиобластом (> 90 %) – первичные, развиваются быстро у пациентов зрелого возраста (в среднем 62 года) и не имеют промежуточных, менее злокачественных, стадий. Две трети пациентов с таким диагнозом имеют историю болезни менее 3 месяцев (Ohgaki et al., 2004). Вторичные глиобластомы составляют менее 10 % от всех выявляемых глиом. Они поражают более молодых пациентов (средний возраст диагноза – 45 лет) и развиваются медленнее из менее злокачественных диффузной или анапластической астроцитомы. В популяционном исследовании было показано, что среднее время прогрессии от глиомы второй



**Рис. 1.** Наиболее частые генетические изменения в глиальных опухолях, приводящие к формированию первичной и вторичной глиобластом (по материалам статьи: Riemenschneider, Jeuken et al. 2010).

ампл. – амплификация, сверхэкспр. – сверхэкспрессия.

степени злокачественности до глиобластомы составляет 5,3 года, от анапластической астроцитомы до глиобластомы – 1,4 года (Ohgaki, Kleihues, 2005). Хотя первичные и вторичные глиобластомы гистологически большей частью неотличимы, они развиваются по разным генетическим путям (Ohgaki, Kleihues, 2007).

### Молекулярно-генетические изменения в процессе онкогенеза глиом

Как и все онкологические заболевания, глиомы развиваются в результате последовательных генетических нарушений, которые накапливаются с прогрессией опухоли. Сейчас известны часто встречающиеся мутации для каждого типа глиом и сформулированы представления о путях формирования первичных и вторичных глиобластом (рис. 1). Первичные глиобластомы (IV степень злокачественности) возникают сразу из клеток-предшественников, минуя стадии глиом низкой степени злокачественности. При этом характер и последовательность молекулярно-генетических нарушений имеют свои

особенности в разных путях формирования глиобластом. В частности, первичные глиобластомы характеризуются частой амплификацией гена *EGFR* и мутациями гена *PTEN* при отсутствии мутаций гена *IDH1*, в то время как во вторичных глиобlastомах часто обнаруживаются мутации генов *TP53* и *IDH1*, но нет амплификации гена *EGFR* (Ohgaki, Kleihues, 2007; Kleihues, Ohgaki, 1999). На хромосомном уровне первичные глиобластомы отличаются от вторичных частой трисомией хромосомы 7, моносомией хромосомы 10, а также приобретением хромосомных плеч 12p, 19q и 20q (Toedt et al., 2011). Тем не менее большая часть генетических изменений в первичных и вторичных глиобlastомах одинакова. Для глиом II и III степеней злокачественности, а также вторичных глиобlastом характерным нарушением являются мутации в генах *IDH1/IDH2*, что предполагает наличие общего предшественника у этих опухолей. В астроцитомах II степени злокачественности часто мутирован ген *TP53*, в то время как для олигодендроглиальных опухолей свойственна делеция участка хромосомы 1p/19q. Молекулярные нару-

шения, связанные с прогрессией опухоли до III степени злокачественности, включают потерю участка хромосомы 9p, а также инактивацию генов *CDKN2A* и *CDKN2B*. При прогрессии до вторичной глиобластомы происходит потеря участка хромосомы 10q и потеря экспрессии гена *DCC* (Riemenschneider et al., 2010).

### Нейральные стволовые и опухолевые стволовые клетки мозга

В 1962 г. впервые в мозге взрослой крысы было обнаружено существование делящихся клеток (Altman, 1962). Впоследствии существование таких клеток было показано и для мозга человека (Kirschenbaum et al., 1994; Uchida et al., 2000). Выделение нейральных стволовых клеток *in vitro* стало возможным благодаря разработке метода получения нейросфер – плавающих сфер, которые формируются из глиальных клеток при выращивании в бессывороточной среде с добавлением митогенов, основного фактора роста фибробластов и эпидермального фактора роста (Reynolds et al., 1992).

В 2002 г. методика получения нейросфер, обычно применяемая для выделения нейральных стволовых клеток, была использована при исследовании опухолей головного мозга, и было установлено, что клетки глиобластомы также способны формировать нейросферы (Ignatova et al., 2002). В результате последующих экспериментов было обнаружено, что клетки глиобластом, формирующие нейросферы, могут дифференцироваться по трем направлениям развития тканей мозга – в нейроны, астроциты и олигодендроциты и, следовательно, могут быть определены как стволовые клетки (Galli et al., 2004). Опухолевые стволовые клетки могут повторять типичные гистологические, цитологические и морфологические черты исходной опухоли человека при пересадке иммунодефицитным мышам даже после многократных последовательных пассажей этих клеток *in vitro*. В отличие от нейросфер, изолированных из нормальной ткани, клетки нейросфер, выделенных из опухоли человека, содержат генетические нарушения и подвержены отклоняющейся от нормы пролиферации и дифференцировке (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003). Кроме того, число нейросфер, полученных *in vitro*, прямо коррелирует с уровнем роста опухоли и инвазии при введении клеток опухоли иммунодефицитным мышам (Zerpernick et al., 2008).

Опухолевые стволовые клетки также рассматриваются как опухоль-иницирующие клетки, которые образуются при трансформации клеток головного мозга и дают начало глиобластам (Ignatova et al., 2002; Hemmati et al., 2003; Galli et al., 2004; Brazel et al., 2005). Однако происхождение этих клеток остается не до конца выясненным. В исследовании Zaidi с соавт. (Zaidi et al., 2009) описаны три возможных источника происхождения опухоль-иницирующих клеток. Такие клетки могут образовываться из зрелых клеток глии, которые в результате последовательных мутаций приобретают характеристики стволовых клеток и при наличии мутаций в онкогенах и онкосупрессорах могут считаться опухолевыми стволовыми клетками. Также источником происхождения опухоль-иницирующих клеток мозга могут быть глиальные клетки-предшественники, которые менее дифференцированы и имеют ограни-

ченный потенциал к самообновлению. Мутации в таких клетках могут приводить к увеличению возможности самообновления, что впоследствии способствует образованию опухоли. Альтернативный вариант происхождения опухолевых стволовых клеток из нейральных стволовых клеток подтверждается значительным сходством между ними (экспрессия одинаковых клеточных маркеров, способность мигрировать сквозь паренхиму мозга, образовывать нейросферы *in vitro*, дифференцироваться в различные типы клеток), а также возникновением глиом вблизи субвентрикулярной зоны – места расположения нейральных стволовых клеток в головном мозге.

Для идентификации ОСК глиом преимущественно используется маркерный белок CD133, экспрессия которого характерна для нормальных нейральных стволовых клеток (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2004; Zaidi et al., 2009). Singh с соавт. (Singh et al., 2004) показали, что даже  $10^2$  CD133+ клеток достаточно для формирования опухолей при имплантации иммунодефицитным мышам, в то время как инъекция  $10^5$  CD133- клеток не обеспечивала образования опухоли. Однако имеются также данные о том, что и CD133- клетки могут формировать нейросферы *in vitro* (Patru et al., 2010) и опухоли при имплантации крысам (Wang et al., 2008). Это свидетельствует о том, что CD133 не является универсальным маркером ОСК, и в настоящее время продолжается поиск маркеров этих клеток.

### Методы лечения глиом

Основными методами в лечении глиом являются хирургическое удаление опухоли, лучевая терапия, химио- и иммунокорректирующая терапия. В редких случаях удается обойтись применением только одного метода, чаще всего для повышения эффективности лечения используется их сочетание. Хирургическое лечение, как правило, сопровождается лучевой терапией и/или каким-либо вариантом химиотерапии. Иммунокорректирующая терапия (применение таких препаратов, как левамизол, Т-активин, тимоген, неовир) улучшает состояние пациентов при проведении им химиотерапевтического лечения (Олюшин, 2005).

Для лечения глиом высокой степени злокачественности возможно применение алкилирующих препаратов нитрозомочевины – кармустина, ломустина и нидрана. За последние пять лет определенную эффективность в комплексном лечении глиом продемонстрировал темодал (темозоломид) – алкилирующий препарат, обладающий высокой противоопухолевой активностью в сочетании с низкой токсичностью по сравнению с другими препаратами. Для повышения чувствительности к темодалу и эффективного лечения опухоли большое значение имеет инактивация гена *MGMT*, которая является следствием делеции гена или метилирования его промотора (Стрельников и др., 2011).

Также для лечения глиом широко используются таргетные препараты. Одним из вариантов действия таких препаратов может быть блокирование сигнальных путей рецепторных тирозинкиназ. На рецепторном уровне основной точкой приложения в этом случае является рецептор эпидермального фактора роста. В настоящее время для лечения глиобластом применяются вещества,

блокирующие функцию этого рецептора моноклональными антителами (например, цетуксимаб C225) или ингибирующие его тирозин-киназную активность (гефинитиб, эрлонитиб, лапатиниб). Однако при потере или мутации гена *PTEN* (опухолевого супрессора) лечение ингибиторами EGFR оказывается неэффективным (Стрельников и др., 2011).

Несмотря на существующие в настоящее время комплексные подходы в лечении глиом, выживаемость пациентов остается крайне низкой, особенно при глиомах высоких степеней злокачественности. Одной из основных проблем в лечении глиом является высокая вероятность возникновения рецидива (Neman, Jandial, 2010).

### Механизмы репарации двуцепочечных разрывов ДНК

Ключевым методом лечения остается применение радиационной терапии. Этот метод основан на действии ионизирующего излучения, которое вызывает нарушения непосредственно в ДНК, наиболее значимыми из которых являются двуцепочечные разрывы, а также формирование свободных радикалов при ионизации молекул воды в клетках. В результате облучения погибает основная масса опухолевых клеток, но часть клеток сохраняет жизнеспособность за счет процессов репарации. Двуцепочечные разрывы ДНК репарируются с помощью двух механизмов: негомологичного соединения концов и гомологической рекомбинации (San Filippo et al., 2008; Kesari et al., 2011).

Первый способ является самым простым и состоит в сшивании концов ДНК. При этом не требуется гомологии последовательности ДНК в местах разрыва, и после удаления поврежденных нуклеотидов происходит лигирование концов ДНК лигазой IV. Вследствие этого такой метод является неточным и приводит к потере генетической информации в области разрыва (Kesari et al., 2011; Abbotts et al., 2014).

Второй механизм репарации – гомологическая рекомбинация – начинается с удаления части нуклеотидов и образования одноцепочечного участка ДНК, который затем внедряется в гомологичную последовательность, образуя Д-петлю (рис. 2). Далее

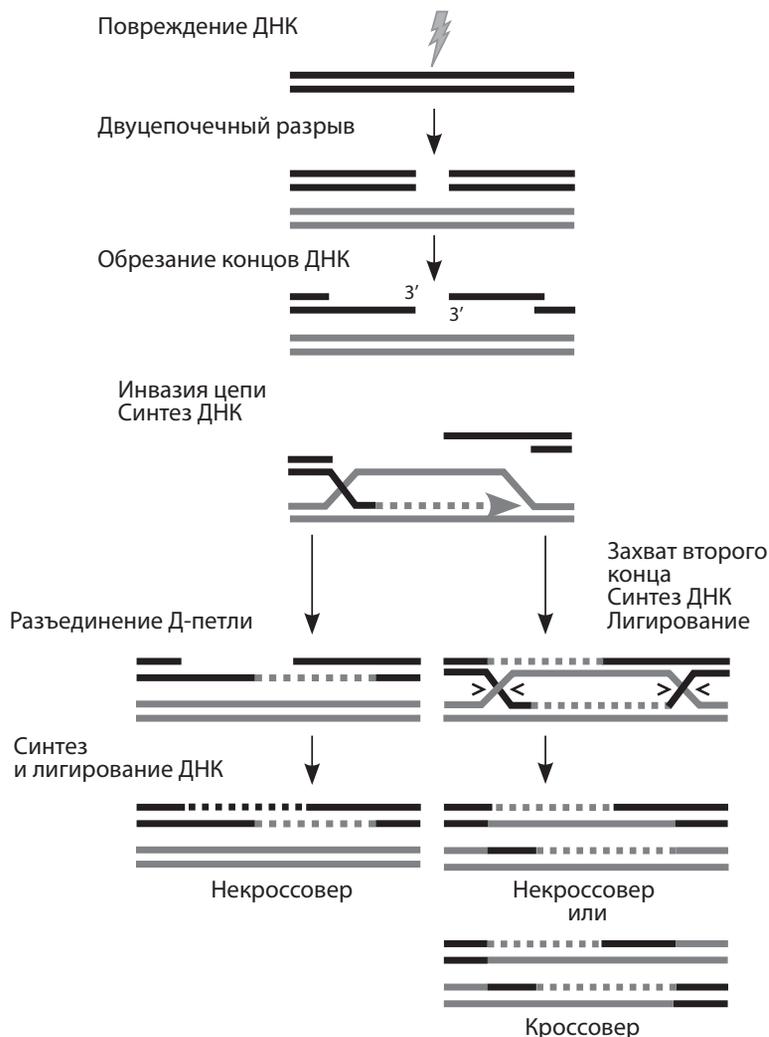


Рис. 2. Пути репарации двуцепочечных разрывов ДНК с помощью гомологической рекомбинации (по: San Filippo et al., 2008).

происходит либо раскручивание петли и высвобождение цепи ДНК с последующим достраиванием и лигированием ДНК, либо могут образоваться структуры Холлидея, разрешение которых приводит к формированию кроссоверных или некроссоверных продуктов (San Filippo et al., 2008).

Гомологическая рекомбинация является более точным методом репарации ДНК, чем негомологическое соединение концов ДНК. Однако ввиду необходимости в последовательности, по образцу которой будет проходить восстановление структуры ДНК, гомологическая рекомбинация может применяться только в делящихся клетках, в то время как негомологичное соединение концов может происходить независимо от стадии клеточного цикла. Если в клетках есть мутации или делеции в генах, регулирующих гомологическую рекомбинацию, то репарация двуцепочечных разрывов будет проводиться с помощью негомологичного соединения концов ДНК, что характерно для репарации в раковых клетках (Ward et al., 2015).

### Роль опухолевых стволовых клеток в развитии устойчивости глиом к радиотерапии

Механизмы, отвечающие за устойчивость глиом к радиотерапии, еще недостаточно изучены, однако уже получены некоторые данные, в частности о роли опухолевых стволовых клеток в этом явлении.

Значимый вклад в развитие этой области внесло исследование Вао с соавт.

(Bao et al., 2006). Авторы продемонстрировали увеличение доли CD133+ клеток в общей опухолевой массе после воздействия излучения. Причем было показано, что происходит увеличение числа выживших клеток именно за счет ОСК. Более того, анализ формирования колоний выявил, что ОСК являются более устойчивыми к облучению, чем основная масса клеток опухоли, и увеличение доли таких клеток происходит за счет снижения апоптотической гибели клеток. Авторы показали, что в ОСК происходит активация точек контроля клеточного цикла, что свидетельствует о стимулировании остановки клеточного цикла и репарации поврежденной ДНК. С помощью метода ДНК-комет было показано, что процесс репарации ДНК в опухолевых стволовых клетках проходит более эффективно, чем в основной массе опухолевых клеток (Bao et al., 2006).

Хотя Bao с соавторами показали, что конверсии CD133-клеток в CD133+ клетки не происходит, данные, полученные Dahan с соавт. (Dahan et al., 2014), свидетельствуют о возможности такого процесса. В этой работе авторы сначала стимулировали дифференцировку ОСК, затем подвергали их ионизирующему излучению и анализировали их способность к снижению степени дифференцировки. Несмотря на первоначальное отсутствие маркеров стволовых клеток и наличие маркеров дифференцированных клеток, после облучения клетки вновь приобретали маркеры стволовых (Dahan et al., 2014).

Похожие результаты получили исследователи, проанализировавшие парафиновые срезы образцов рецидивирующей опухоли у пациентов, прошедших курс радиотерапии. Было показано, что у таких больных происходит накопление CD133+ клеток по сравнению с образцами опухолей, полученными от пациентов, не подвергавшихся облучению (Tamura et al., 2010).

Австралийские ученые также обнаружили, что CD133+ клетки устойчивы к действию радиотерапии (Lim et al., 2012). Анализ экспрессии маркеров гомологической рекомбинации Rad51 и Brca1 выявил, что репарация ДНК в опухолевых стволовых клетках происходит именно с помощью гомологической рекомбинации. Кроме того, ослабленная активация чекпойнт-киназ свидетельствовала об отсутствии точки контроля G1-S, что приводило к переходу клеток в фазу S и последующей гомологической рекомбинации. При этом было показано, что в нормальных стволовых клетках для репарации двуцепочечных разрывов используется преимущественно негомологичное соединение концов (Aguilar-Morante et al., 2011; Lim et al., 2014). Далее этим же коллективом авторов было показано, что при направленном ингибировании гомологической рекомбинации происходит увеличение чувствительности ОСК к радиотерапии, аналогичные результаты были получены в исследованиях (Biddlestone-Thorpe et al., 2013) на перевиваемых линиях глиом *in vivo*. По результатам экспериментов было отмечено, что после имплантации клеток глиом мышам и проведения курса терапии с использованием ингибиторов гомологической рекомбинации в сочетании с ионизирующим излучением наблюдалась повышенная выживаемость животных по сравнению с контрольной группой животных, не получавших лечения, а также животных, подвергавшихся

воздействию либо ионизирующего излучения, либо ингибиторов гомологической рекомбинации. Более того, клетки, мутантные по TP53, были более чувствительны к радиотерапии по сравнению с клетками с функциональной формой белка. Похожие результаты были получены авторами при анализе эффективности ингибиторов гомологической рекомбинации на культурах стволовых клеток глиом (Vecchio et al., 2014).

В то же время имеются данные о более высокой чувствительности к ионизирующему излучению CD133+ клеток глиом, полученных в виде первичных культур нейросфер, по сравнению с перевиваемыми клеточными линиями глиом (McCord et al., 2009). Методом анализа колоний авторы продемонстрировали большую чувствительность ОСК к излучению по сравнению с перевиваемыми клеточными линиями глиом. С помощью метода анализа фосфорилирования гистона H2AX и метода ДНК-комет авторы выявили снижение способности ОСК к репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Однако в работе Lee с соавт. (Lee et al., 2006) подвергается сомнению правомерность сравнения характеристик ОСК и перевиваемых клеточных линий глиом, так как было показано, что постоянные клеточные линии не могут служить адекватной моделью развития опухоли из-за значительных отличий от исходной опухоли.

В исследовании Ropolo (Ropolo et al., 2009) сообщалось, что способность к репарации ДНК не отличалась у CD133+ и CD133- клеток. Несмотря на то что по результатам исследования стволовые клетки сохраняли основные характеристики пролиферирующих клеток и в них поддерживалась постоянная активация чекпойнт-киназ, никакого стимулирования репарации ДНК в этих клетках не наблюдалось. Причем использовались те же методы, что и в исследовании Bao с соавт. (анализ фосфорилирования гистона  $\gamma$ H2AX, вестерн-блот и метод ДНК-комет). Авторы предположили, что такое несоответствие может свидетельствовать о том, что клеточные линии глиом отличаются по каскаду реакций, запускаемых после воздействия ионизирующего излучения (Ropolo et al., 2009).

Устойчивость глиом к химио- и радиотерапии остается одной из основных причин неблагоприятного прогноза для пациентов. Развитие устойчивости – это комплексный процесс, он вовлекает множество механизмов/путей, одним из наиболее значимых является репарация ДНК. В данной статье представлена информация о классификации и генетических нарушениях в глиомах, методах лечения этих опухолей, а также описаны результаты исследований, касающихся роли опухолевых стволовых клеток в возникновении рецидивов заболевания. Было показано, что количество этих клеток увеличивается после обработки гамма-излучением за счет более низкого уровня апоптотической гибели этих клеток. Основным механизмом репарации ДНК в этих клетках является гомологическая рекомбинация, причем ее ингибирование приводит к увеличению чувствительности опухолевых клеток к радиотерапии. Несмотря на то что имеются данные о высокой чувствительности ОСК к гамма-излучению, эффективная репарация в раковых стволовых

клетках рассматривается как основная причина устойчивости глиом к действию радиотерапии.

## Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке по базовому бюджетному проекту № VI.58.1.3.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Олюшин В.Е. Глиальные опухоли головного мозга: краткий обзор литературы и протокол лечения больных. *Нейрохирургия*. 2005;4:41-47.
- Стрельников В.В., Землякова В.В. Молекулярно-генетическая диагностика опухолей головного мозга. Введение в молекулярную диагностику. Под ред. М.А. Пальцева, Д.В. Залетаева М.: Медицина, 2011;2:486-503.
- Abbotts R., Thompson N., Madhusudan S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. *Cancer Manag. Res.* 2014;6:77-92. DOI: 10.2147/CMAR.S50497
- Aguiar-Morante D., Cortes-Canteli M., Sanz-Sancristobal M., Santos A., Perez-Castillo A. Decreased CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  expression inhibits the growth of glioblastoma cells. *Neuroscience*. 2011;176:110-119. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.12.025
- Altman J. Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp. Neurol.* 1962;5:302-318.
- Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-760. DOI: 10.1038/nature05236
- Biddlestone-Thorpe L., Sajjad M., Rosenberg E.J., Beckta M., Valerie N.C., Tokarz M., Adams B.R., Wagner A.F., Khalil A., Gilford D., Golding S.E., Deb S., Temesi D.G., Lau A., O'Connor M.J., Choe K.S., Parada L.F., Lim S.K., Mukhopadhyay N.D., Valerie K. ATM kinase inhibition preferentially sensitizes p53-mutant glioma to ionizing radiation. *Clin. Cancer Res.* 2013;19(12):3189-3200. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3408
- Brazel C.Y., Limke T.L., Osborne J.K., Miura T., Cai J., Pevny L., Rao M.S. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell*. 2005;4(4):197-207. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2005.00158.x
- Dahan P., Martinez Gala J., Delmas C., Monferran S., Malric L., Zentkowski D., Lubrano V., Toulas C., Cohen-Jonathan Moyal E., Lemarie A. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis.* 2014. DOI: 10.1038/cddis.2014.509
- Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A., De Vitis S., Fiocco R., Foroni C., Dimeco F., Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7011-7021. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1364
- Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A., Masterman-Smith M., Geschwind D.H., Bronner-Fraser M., Kornblum H.I. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003;100(25):15178-15183. DOI: 10.1073/pnas.2036535100
- Heywood R.M., Marcus H.J., Ryan D.J., Piccirillo S.G., Al-Mayhany T.M., Watts C. A review of the role of stem cells in the development and treatment of glioma. *Acta Neurochir. (Wien)*. 2012;154(6):951-969. DOI: 10.1007/s00701-012-1338-9
- Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia*. 2002;39(3):193-206. DOI: 10.1002/glia.10094
- Kesari S., Advani S.J., Lawson J.D., Kahle K.T., Ng K., Carter B., Chen C.C. DNA damage response and repair: insights into strategies for radiation sensitization of gliomas. *Future Oncol.* 2011;7(11):1335-1346. DOI: 10.2217/fon.11.111
- Kirschenbaum B., Nedergaard M., Preuss A., Barami K., Fraser R.A., Goldman S.A. *In vitro* neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb. Cortex*. 1994;4(6):576-589.
- Kleihues P., Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1999;1(1):44-51.
- Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N.M., Pastorino S., Purow B. W., Christopher N., Zhang W., Park J.K., Fine H.A. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*. 2006;9(5):391-403. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.03.030
- Lim Y.C., Roberts T.L., Day B.W., Harding A., Kozlov S., Kijas A.W., Ensby K.S., Walker D.G., Lavin M.F. A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Mol. Cancer Ther.* 2012;11(9):1863-1872. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-1044
- Lim Y.C., Roberts T.L., Day B.W., Stringer B.W., Kozlov S., Fazry S., Bruce Z.C., Ensby K.S., Walker D.G., Boyd A.W., Lavin M.F. Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells. *Mol. Oncol.* 2014;8(8):1603-1615. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.06.012
- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4
- McCord A.M., Jamal M., Williams E.S., Camphausen K., Tofilon P.J. CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(16):5145-5153. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0263
- Neman J., Jandial R. Decreasing glioma recurrence through adjuvant cancer stem cell inhibition. *Biologics*. 2010;4:157-162. DOI: 10.2147/BTT.S9497
- Ohgaki H., Dessen P., Jourde B., Horstmann S., Nishikawa T., Di Patre P.L., Burkhard C., Schüller D., Probst-Hensch N.M., Maiorica P.C., Baeza N., Pisani P., Yonekawa Y., Yasargil M.G., Lütolf U.M., Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892-6899. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
- Ohgaki H., Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005;64(6):479-489.
- Ohgaki H., Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 2007;170(5):1445-1453. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070011
- Okamoto Y., Di Patre P.L., Burkhard C., Horstmann S., Jourde B., Fahey M., Schüller D., Probst-Hensch N.M., Yasargil M.G., Yonekawa Y., Lütolf U.M., Kleihues P., Ohgaki H. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2004;108(1):49-56. DOI: 10.1007/s00401-004-0861-z
- Patru C., Romao L., Varlet P., Coulombel L., Raponi E., Cadusseau J., Renault-Mihara F., Thirant C., Leonard N., Berhneim A., Mihalescu-Maingot M., Haiech J., Bièche I., Moura-Neto V., Daumas-Duport C., Junier M.P., Chneiweiss H. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioma-neuronal tumors. *BMC Cancer.* 2010;10:66. DOI: 10.1186/1471-2407-10-66
- Reynolds B.A., Tetzlaff W., Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 1992;12(11):4565-4574.
- Riemenschneider M.J., Jeuken J.W., Wesseling P., Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* 2010;120(5):567-584. DOI: 10.1007/s00401-010-0736-4
- Ropolo M., Daga A., Griffero F., Foresta M., Casartelli G., Zunino A.,

- Poggi A., Cappelli E., Zona G., Spaziante R., Corte G., Frosina G. Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Mol. Cancer Res.* 2009;7(3):383-392. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0409
- San Filippo J., Sung P., Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 2008;77:229-257. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255
- Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J., Dirks P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-5828.
- Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401. DOI: 10.1038/nature03128
- Tamura K., Aoyagi M., Wakimoto H., Ando N., Nariai T., Yamamoto M., Ohno K. Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by Gamma Knife surgery plus external beam radiation. *J. Neurosurg.* 2010;113(2):310-318. DOI: 10.3171/2010.2.JNS091607
- Toedt G., Barbus S., Wolter M., Felsberg J., Tews B., Blond F., Sabel M.C., Hofmann S., Becker N., Hartmann C., Ohgaki H., von Deimling A., Wiestler O.D., Hahn M., Lichter P., Reifenberger G., Radlwimmer B. Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. *Int. J. Cancer.* 2011;128(5):1095-1103. DOI: 10.1002/ijc.25448
- Uchida N., Buck D.W., He D., Reitsma M.J., Masek M., Phan T.V., Tsukamoto A.S., Gage F.H., Weissman I.L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000;97(26):14720-14725. DOI: 10.1073/pnas.97.26.14720
- Vecchio D., Daga A., Carra E., Marubbi D., Baio G., Neumaier C.E., Vagge S., Corvò R., Pia Brisigotti M., Louis Ravetti J., Zunino A., Poggi A., Mascelli S., Raso A., Frosina G. Predictability, efficacy and safety of radiosensitization of glioblastoma-initiating cells by the ATM inhibitor KU-60019. *Int. J. Cancer.* 2014;135(2):479-491. DOI: 10.1002/ijc.28680
- Wang J., Sakariassen P., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Bøe S.O., Svendsen A., Prestegarden L., Røsland G., Thorsen F., Stuhr L., Molven A., Bjerkvig R., Enger P. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int. J. Cancer.* 2008;122(4):761-768. DOI: 10.1002/ijc.23130
- Ward A., Khanna K.K., Wiegman A.P. Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51. *Cancer Treat. Rev.* 2015;41(1):35-45. DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.10.006
- Zaidi H.A., Kosztowski T., DiMeco F., Quiñones-Hinojosa A. Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis. *J. Neurooncol.* 2009;93(1):49-60. DOI: 10.1007/s11060-009-9856-x
- Zeppernick F., Ahmadi R., Campos B., Dictus C., Helmke B.M., Becker N., Lichter P., Unterberg A., Radlwimmer B., Herold-Mende C.C. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(1):123-129. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0932