

УДК 616-006.04:576.08

## СВОЙСТВА ПОТОМКОВ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМ A172, R1, T2 И T98G, ВЫЖИВАЮЩИХ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА ГАММА-НОЖЕ

© 2025 г. А. А. Пиневи́ч<sup>1, 2, \*</sup>, И. Ю. Крутецкая<sup>1</sup>, Н. Л. Варта́нян<sup>1</sup>, А. Ю. Столбо́вая<sup>1</sup>, С. В. Соловьёва<sup>2</sup>, А. В. Карташе́в<sup>1</sup>, Л. Н. Киселева<sup>1</sup>, М. П. Самойлович<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А. М. Гранова, Санкт-Петербург, 197758, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра цитологии и гистологии, Санкт-Петербург, 199034, Россия

\*E-mail: agniapinevich@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2025

После доработки 09.06.2025

Принята к публикации 10.06.2025

**Обоснование и цель работы.** Ключевой проблемой лечения пациентов с глиобластомами является развитие рецидивов, которые формируются потомками резистентных клеток, выживающих после радио- и (или) химиотерапии. Гамма-нож Лекселла позволяет проводить однократное высокодозное облучение опухоли, которое снижает вероятность появления клеток, приобретающих свойство резистентности в ходе длительной радиотерапии с фракционированием дозы, однако не исключает сохранения единичных исходно резистентных клеток. Цель работы — получить и изучить свойства потомков радиорезистентных клеток глиобластом человека линий A172, R1, T2 и T98G, которые возобновляли пролиферацию после облучения на гамма-ноже. **Материал и методика.** Было разработано устройство для фиксации и позиционирования клеточных культур при прецизионном облучении. **Результаты и обсуждение.** Дозы облучения, после которых единичные высоко резистентные клетки возобновляли пролиферацию, составили 9 Гр (A172), 10 Гр (R1), 11 Гр (T2) и 14 Гр (T98G). Возобновление пролиферации потомков радиорезистентных клеток происходило через 14–28 сут после облучения, что вдвое превышает общепринятый срок оценки жизнеспособности опухолевых клеток после облучения. Численность КОЕ была одного порядка и не изменялась для всех линий глиобластом при увеличении дозы облучения сверх полудетальной в широком диапазоне. Проведен поиск потенциальных молекулярных биомаркеров-мишеней терапии глиобластом. Показано, что потенциальной прогностической значимостью обладали гены, кодирующие интерлейкины IL-6 и IL-8, в то время как прогностическая ценность экспрессии *MGMT*, *VEGF*, *HGF*, *TNC*, *THBS1*, *ASAH1*, *FAP*, *MMP2*, *PD-L1* и *PD-L2* представляется неоднозначной, поскольку радиорезистентные клетки исследованных линий глиобластом демонстрировали индивидуальный ответ на облучение на гамма-ноже, вне зависимости от их радиочувствительности. **Заключение.** Полученные результаты вносят вклад в понимание гетерогенности глиобластом и способствуют более эффективной разработке протоколов лечения данного заболевания.

**Ключевые слова:** глиобластома, A172, R1, T2, T98G, облучение, гамма-нож, радиорезистентные клетки, КОЕ, IL-6, IL-8

**Принятые сокращения:** КОЕ — колониеобразующая единица.

**DOI:** 10.7868/S3034606125030053

Глиомы — собирательный термин, объединяющий первичные опухоли центральной нервной системы глиального происхождения. По данным CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States), частота глиом составляет до 80 % от всех злокачественных первичных опухолей центральной нервной системы (Hanif et al., 2017), или 21.4 случая на 100 тыс. чел. населения (Ostrom et al., 2022). Наиболее распространенными и злокачественными

ми глиомами являются первичные астроцитомы, или мультиформные глиобластомы, которые составляют более 60 % опухолей центральной нервной системы взрослых (Rock et al., 2012).

Несмотря на проводимое агрессивное лечение, включающее оперативное удаление опухоли, радиотерапию и химиотерапию, практически все глиобластомы рецидивируют, причем в 90 % случаев очаги рецидивов локализованы в пределах двух

сантиметров от очага первичной опухоли (Reitman et al., 2018). Дальнейшее лечение включает повторные операции, радио-, химио- и иммунотерапию, а также комбинации этих методов, однако медиана выживаемости пациентов составляет не более 15 мес. (Thakkar et al., 2014). Неудовлетворительный эффект лечения связывают прежде всего с крайней гетерогенностью глиобластом, поскольку клетки, входящие в их состав, обладают разной чувствительностью к радио- и химиотерапии (Eisenbarth, Wang, 2023).

При оценке радиочувствительности глиобластом, как правило, определяют дозу облучения, при которой спустя 2—18 сут наступает гибель опухолевых клеток (Smith et al., 2010; Hoppmann et al., 2022). Однако существует и другой ключевой показатель — содержание в опухоли единичных высокорезистентных клеток. Они со временем не только возобновляют пролиферацию, но и, будучи метаболически активными, выделяют ростовые факторы и цитокины, которые модифицируют микроокружение опухоли, что способствует появлению рецидивов (Olivier et al., 2021). Для увеличения эффективности радиотерапии глиобластом необходимо оценивать не только их общую радиочувствительность, но и содержание в них высоко резистентных клеток.

Стандартный протокол лечения глиобластом включает фракционированное облучение на линейном ускорителе по 2 Гр за сеанс до достижения суммарной дозы 60 Гр (Vilar et al., 2022). Радиохирургическое облучение гамма-ножом Лекселла позволяет за 1—2 сеанса подвести полную терапевтическую дозу к зоне опухолевого поражения (Sadik et al., 2018; Sun et al., 2024; Valerio et al., 2024). Используют дозы облучения в диапазоне 12—25 Гр, при этом изодоза покрывает 89—100 % целевого объема (Sadik et al., 2018).

Между фракционированным и однократным высокодозным облучением с помощью гамма-ножа имеется принципиальная разница по эффекту действия на опухолевые клетки и окружающие ткани. Фракционированное облучение обладает более щадящим действием на окружающие ткани, которые быстрее регенерируют по сравнению с опухолевыми клетками (Ali et al., 2020). В то же время использование фракционированного облучения низкой мощности приводит к появлению в опухоли вторично резистентных клеток, которые приобретают это свойство в ходе селекции и появления мутаций (Tang et al.,

2022). Однократное высокодозное облучение приводит к гибели клеток в ограниченном объеме (до 9.95 мм<sup>3</sup>), получающем максимальную дозу (Sadik et al., 2018), и минимально затрагивает окружающие ткани, однако по периферии фокуса облучения могут сохраняться первично резистентные опухолевые клетки, которые получают меньшую дозу и, оставаясь жизнеспособными, могут в дальнейшем определять неблагоприятный исход терапии.

Несмотря на то, что облучение с помощью гамма-ножа является одним из современных прецизионных методов лечения больных с рецидивирующими глиобластомами, опубликованы лишь единичные работы, в которых проводили *in vitro* оценку радиочувствительности клеток глиобластом после облучения гамма-ножом (Kim et al., 2004; Smith et al., 2010).

Цель нашей работы заключалась в изучении свойств потомков одиночных радиорезистентных клеток глиобластом человека разных линий, полученных в результате облучения на гамма-ноже и последующего длительного культивирования.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Происхождение клеточных линий.** Линии глиобластом человека A172 и T98G были получены из коллекции клеточных культур Научно-исследовательского института гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия). Линии глиобластом человека R1 и T2 были выделены из опухолевого материала пациентов в Петербургском институте ядерной физики им. Б. П. Константинова национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Санкт-Петербург, Россия). Все линии были охарактеризованы нами ранее (Киселева и др., 2016, 2017).

**Культивирование клеточных линий.** Клетки глиобластом культивировали в ростовой среде  $\alpha$ MEM («БиолоТ», Россия), содержащей 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 0.5 % гентамицина («БиолоТ», Россия). Культивирование проводили в вентилируемых пластиковых флаконах площадью 12.5 см<sup>2</sup>, а также 24- и 96-луночных планшетах (Jet Biofil, Китай) при 37 °C и 6 % CO<sub>2</sub>. Пересев клеток проводили с помощью 0.25 %-ного раствора трипсина с версеном («БиолоТ», Россия).

**Облучение клеток на аппарате Гамма-нож.** Культуры клеток глиобластом, находящиеся в логарифмической фазе роста, пересеивали в ячейки 24-луночных планшетов по  $(1-1.3) \times 10^5$  кл./лунку в объеме 1 мл. Посевную дозу рассчитывали таким образом, чтобы через 1 сут культивирования клетки сформировали 70–90 %-ный конфлюэнтный монослой. Спустя 24 ч планшеты герметизировали с помощью ленты Parafilm M (Amcor, США) и помещали в специально разработанное устройство, предназначенное для фиксации и позиционирования клеточных культур при прецизионном облучении (Карташев и др., 2021).

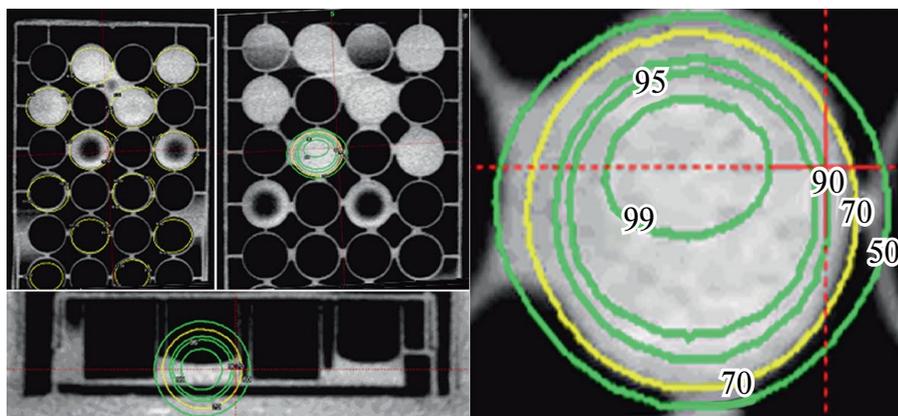
Культуры подвергали действию гамма-излучения на радиотерапевтическом аппарате Leksell Gamma Knife C (Elekta, Швеция) с 201 сфокусированным источником излучения  $^{60}\text{Co}$ . Облучение проводили однократно с использованием коллиматора диаметром 16 мм. Мощность дозы составляла 3.236 Гр/мин. Дозиметрический план создавали с использованием системы планирования Gamma Plan 11.3 (Elekta, Швеция). Распределение доз облучения рассчитывали индивидуально для каждой лунки. Краевая доза составляла 70 % от максимальной дозы облучения в лунке (рис. 1). При выборе диапазона доз руководствовались результатами, полученными при облучении исследуемых клеточных культур на линейном ускорителе Elekta Precise Treatment System (Elekta, Швеция) (Киселева и др., 2018б).

Для проверки расчетных данных, полученных с помощью системы планирования, проводили пленочную дозиметрию. Были использованы радиохромные пленки Gafchromic EBT Films (Ashland,

США), которые помещали на дно планшетов для культивирования клеток, лунки которых были заполнены 1 мл жидкой фазы. Для чтения показаний использовали сканер EPSON Expression 11000XL (Epson, Япония). Калибровочные данные были получены с использованием двумерной детекторной матрицы MatriXX (IBA, Германия). Обработку и анализ данных выполняли, используя программное обеспечение MATLAB R2010a (The MathWorks, США) и OmniPro I'mRT v1.7 (IBA, Германия).

**Культивирование облученных клеток.** После облучения 24-луночные планшеты с клетками помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор на 2 ч. Затем клетки снимали с пластика с помощью 0.25 %-ного раствора трипсина с версеном, переносили в свежую ростовую среду и считали клетки, используя счетчик Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, США). Облученные в одной дозе клетки из каждой лунки равномерно рассеивали в 36 ячеек шести 96-луночных планшетов. В течение последующих 6 недель один из дублирующих планшетов 1 раз в неделю использовали для подсчета числа клеток и морфологических исследований. Облученные культуры, в которых после гибели большей части клеточной популяции со временем возобновлялась пролиферация одиночных клеток, пересеивали и наращивали для дальнейших исследований; эти клетки являлись потомками наиболее радиорезистентных клеток глиобластом. Контрольные необлученные клеточные культуры подвергали аналогичным процедурам.

**Определение колониеобразующей способности клеток.** Оценку численности клеток, способных



**Рис 1.** Изодозные кривые в планшете для культивирования клеток. Зеленые кривые — процентные значения доз облучения клеточных культур. Желтые кривые — краевые зоны облучения.

к пролиферации и формированию колоний (колониобразующих единиц, КОЕ) проводили в популяциях интактных клеток и клеток, перенесших облучение на аппарате гамма-нож в разных дозах. Интактные клетки рассеивали в концентрациях 25—1000 кл./мл. Перенесшие облучение клетки через 2 ч после лучевого воздействия рассеивали в концентрациях 40 000—250 000 кл./мл. Дважды в неделю в необлученных и облученных культурах проводили замену ростовой среды. Через 1—6 нед, в зависимости от динамики нарастания, клетки фиксировали и окрашивали по Май-Грюнвальду—Гимзе. Подсчет числа колоний, содержащих не менее 50 клеток, проводили с использованием бинокулярного стереоскопического микроскопа «Микромед МС-2-ZOOM» («Микромед», Россия). Частоту КОЕ определяли как отношение числа колоний к посевной дозе и выражали в процентах.

**Определение ростовых параметров клеточных культур.** Через 7, 14, 21, 28 и 40 сут культивирования после облучения клетки снимали с поверхности планшетов с помощью 0.25 %-ного раствора трипсина с версеном и определяли их количество с помощью счетчика Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, США). Время удвоения ( $T_d$ ) численности популяций рассчитывали по формуле:  $T_d = dt \times \ln 2 / \ln(N / N_0)$ , где  $dt$  — время культивирования клеток от посева до снятия культуры (ч),  $N$  — число клеток при снятии культуры,  $N_0$  — число клеток при посеве культуры.

**Анализ морфологии.** Живые клетки наблюдали и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа со встроенной камерой Primo Vert (Carl Zeiss, Германия). Клетки фиксировали ледяным карбинолом, окрашивали по Май-Грюнвальду—Гимзе и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Diaphot, оборудованного камерой Nikon D5600 (Nikon, Япония).

**Оценка экспрессии генов с помощью метода ПЦР в реальном времени.** Определение активности генов проводили после достижения клетками 70—90 %-ного конфлюентного монослоя. Тотальную клеточную РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent согласно рекомендациям производителя (Life Technologies, США). Этапы проведения анализа описаны нами ранее (Киселева и др., 2016; Пиневиц и др., 2023). Базовый уровень активности генов представляли в виде  $\Delta CT$  — разницы между пороговым циклом исследуемого гена и гена

домашнего хозяйства *GAPDH*. При  $\Delta CT \leq 6.5$  активность гена расценивали как высокую, значения  $\Delta CT \geq 13.0$  соответствовали малоактивному или неактивному состоянию гена, значения  $\Delta CT$  в интервале 6.5—13.0 расценивали как средние. Для сравнения уровней активности генов в клетках до и после облучения использовали метод относительного количественного определения экспрессии генов (метод  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , где  $2^{-\Delta\Delta CT}$  — кратность разницы между экспрессией гена в интактных и подвергнутых облучению клетках) (Livak, Schmittgen, 2001).

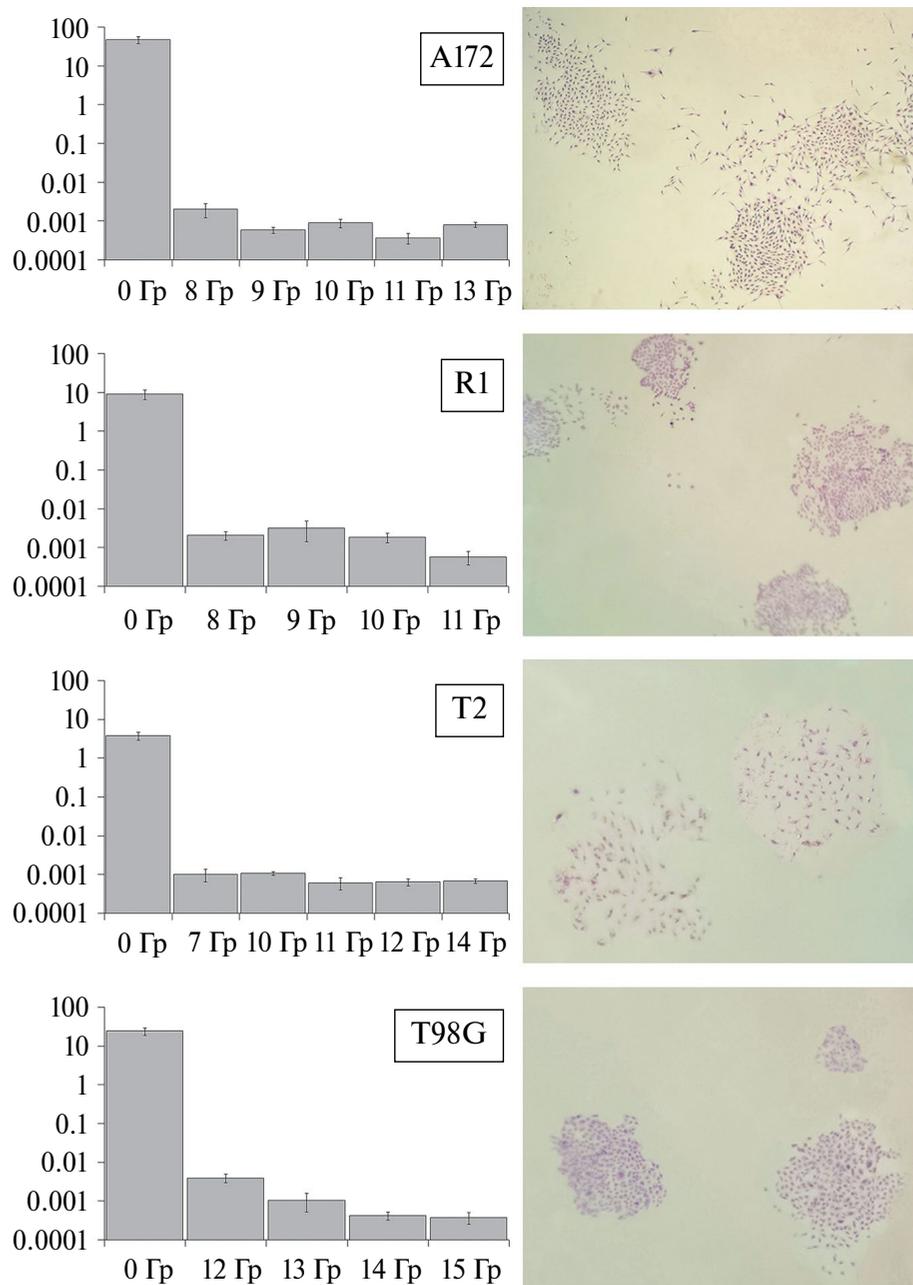
**Статистическая обработка.** Все эксперименты были проведены не менее трех раз. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Данные представлены как среднее значение и его стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). В большинстве случаев для проверки достоверности различий независимых выборок применяли критерий Манна—Уитни, статистически значимыми считали различия с уровнем значимости  $P < 0.05$ .

**Использованные реактивы:** среда  $\alpha$ MEM, гентамицин, раствор 0.25 %-ного трипсина с версеном, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), деионизированная вода («БиолоТ», Россия), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), карбинол («Вектон», Россия), набор красителей Май-Грюнвальд Гимза (BioVitrum, Россия), TRIzol Reagent (Life Technologies, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Объектами изучения были четыре клеточные линии глиобластом человека (A172, R1, T2 и T98G), которые обладают значительно различающимися характеристиками и в совокупности представляют модели, отражающие гетерогенность клеточного состава этих опухолей (Киселева и др., 2016; 2017). Оценка радиочувствительности линий глиобластом проводили, используя диапазон доз ионизирующего излучения 3—18 Гр.

**Частота КОЕ в линиях глиобластом после облучения.** Выявление и количественную оценку радиорезистентных клеток, способных восстановить пролиферацию, проводили, определяя число КОЕ, сформировавшихся спустя 1—6 нед после облучения глиобластом. В интактных культурах наиболее высокое содержание КОЕ (47 %) было выявлено в линии A172, то есть половина облученных клеток этой линии пролиферировала



**Рис. 2.** Колониеобразующие единицы (КОЕ) в популяциях интактных и облученных клеток глиобластом. Слева гистограммы числа КОЕ; по горизонтали — доза облучения, Гр; по вертикали — частота КОЕ,%. Справа показан внешний вид колоний в интактных культурах глиобластом, окраска по Май-Грюнвальду-Гимзе.

с образованием клонов (рис. 2). Наименьшее содержание КОЕ было зарегистрировано в линии T2, где на каждые 100 клеток интактной культуры приходилось в среднем 3.75 КОЕ. Для линии R1 этот показатель составил 9%, а для линии T98G — 24.2%.

Были определены дозы облучения, после которых на 7-е сут культивирования половина исходного количества клеток сохраняла жизнеспособность.

Полулетальная доза для клеток линии A172 составила 4–5 Гр, для T2 — 7–8 Гр, для R1 — 9 Гр и для T98G — 11 Гр. Облучение культур глиобластом в дозах, близких к полулетальным, резко снижало число КОЕ по сравнению с интактными культурами. Увеличение доз облучения сверх полулетальных на 3–7 Гр не приводило к снижению частоты выявляемых КОЕ (рис. 2). Так, для клеток A172 после облучения в дозах 9–13 Гр частота

КОЕ не изменялась и составляла 4–9 на  $10^6$  облученных клеток. Однако по мере увеличения дозы облучения возрастало время от момента воздействия до формирования колоний численностью более 50 клеток. В интактных культурах А172 это время составляло 8 сут, после облучения в дозе 8 Гр — 14 сут, после облучения в дозах 9–10 Гр — 18 сут, а при дозах от 11 Гр — 34 сут.

Аналогичные тенденции были выявлены и для других линий глиобластом. Так, при облучении клеток Т2 в дозах 10–14 Гр выявляли 6–11 КОЕ на  $10^6$  облученных клеток. Срок формирования колоний при этом возрастал от 12 в интактных культурах до 14 сут после облучения в дозах 12–14 Гр. Для R1 этот показатель составлял 6–15 КОЕ на  $10^6$  клеток, облученных в дозах 9–11 Гр. В наиболее резистентной линии Т98G, облученной в диапазоне 13–15 Гр, было выявлено 4–10 КОЕ на  $10^6$  клеток, а срок выявления колоний возрастал от 7 (в интактных клетках) до 21 сут после облучения.

#### Динамика численности клеток после облучения.

Результаты оценки динамики численности клеток в культурах глиобластом после облучения в разных дозах приведены на рис. 3.

В течение 2 нед после облучения происходила массовая гибель клеток глиобластом. В культурах А172 и R1, облученных в дозах 8 и 9 Гр, сохранялись единичные резистентные клетки, за счет пролиферации которых к 40-м сут происходило полное восстановление численности исходных популяций. После облучения в дозах 10 Гр и выше в культурах А172 пролиферация не возобновлялась, в то время как в культурах R1 после облучения в дозе 10 Гр за счет пролиферации резистентных клеток к 40-м сут культивирования численность популяций достигала до 10% от исходной. Доза облучения 15 Гр была летальной для клеток линий А172 и R1.

Облучение линии Т2 в дозе 10 Гр приводило за счет пролиферации потомков резистентных клеток к полному восстановлению численности исходных популяций к 40-м сут культивирования. Дозы лучевого воздействия 11 и 12 Гр вызывали снижение численности клеток ниже 30% от исходного числа в течение первых 2 нед, при дальнейшем культивировании баланс гибели и пролиферации потомков резистентных клеток не приводил к восстановлению исходной численности популяций. Наконец, облучение в дозах 13 и 15 Гр вызывало

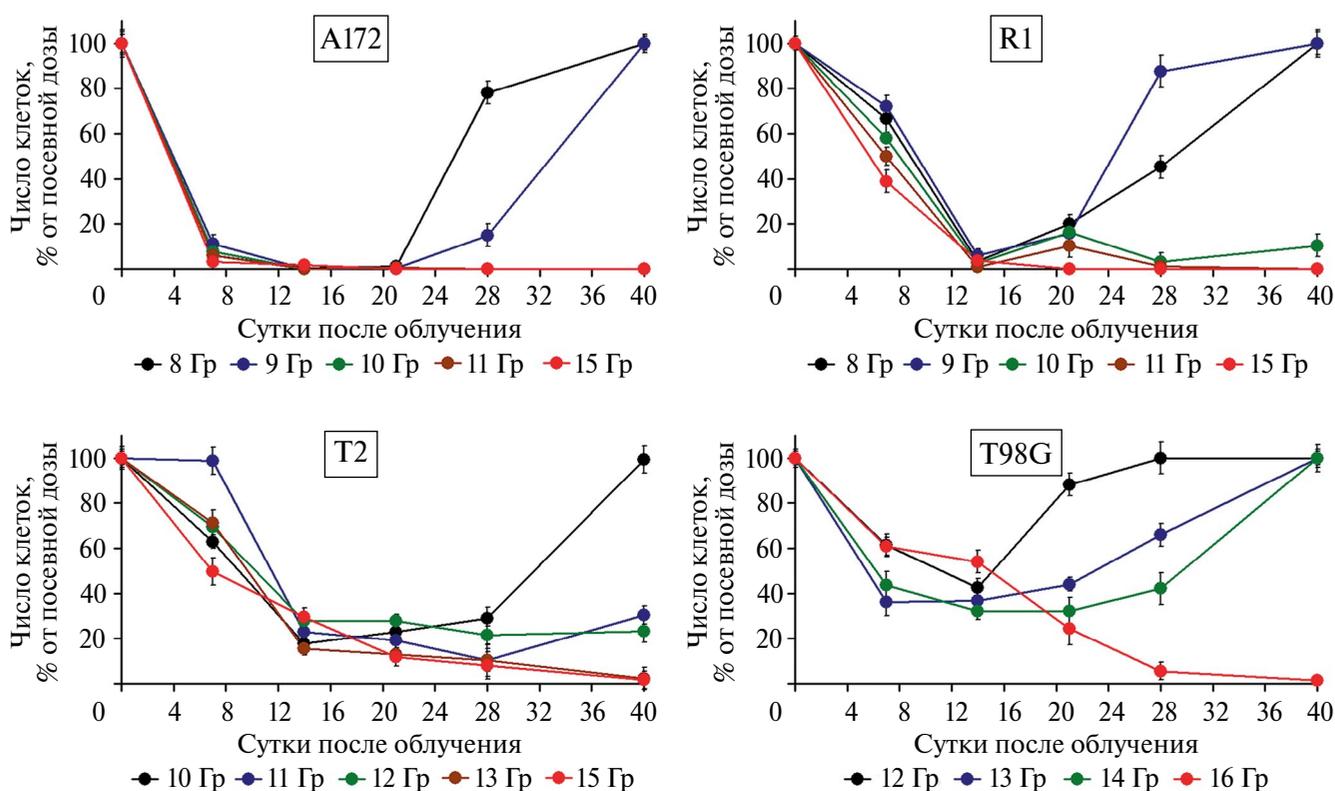


Рис. 3. Динамика численности клеток в культурах глиобластом после облучения в разных дозах.

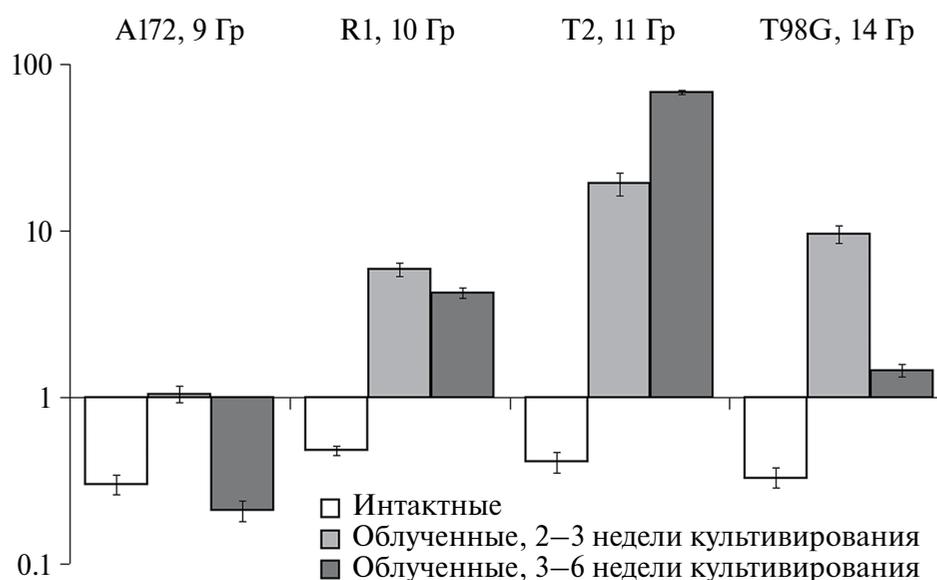
прекращение пролиферации резистентных клеток, однако культуры не погибали, поскольку в них сохранялись популяции непролиферирующих переживающих клеток.

Для клеток наиболее радиорезистентной линии T98G использовали дозы лучевого воздействия 12—16 Гр. Пролиферация потомков резистентных к облучению клеток приводила к восстановлению исходной численности популяций к 40-м сут культивирования после облучения в дозах 12—14 Гр. Облучение в дозе 16 Гр вызывало остановку пролиферации потомков резистентных клеток, но в культурах в течение всего срока наблюдения сохранялись жизнеспособные переживающие клетки. Характеристики переживающих клеток, сохраняющихся в глиобlastомах T2 и T98G после фракционированного облучения, приведены в публикации Киселевой и авторов (2018б).

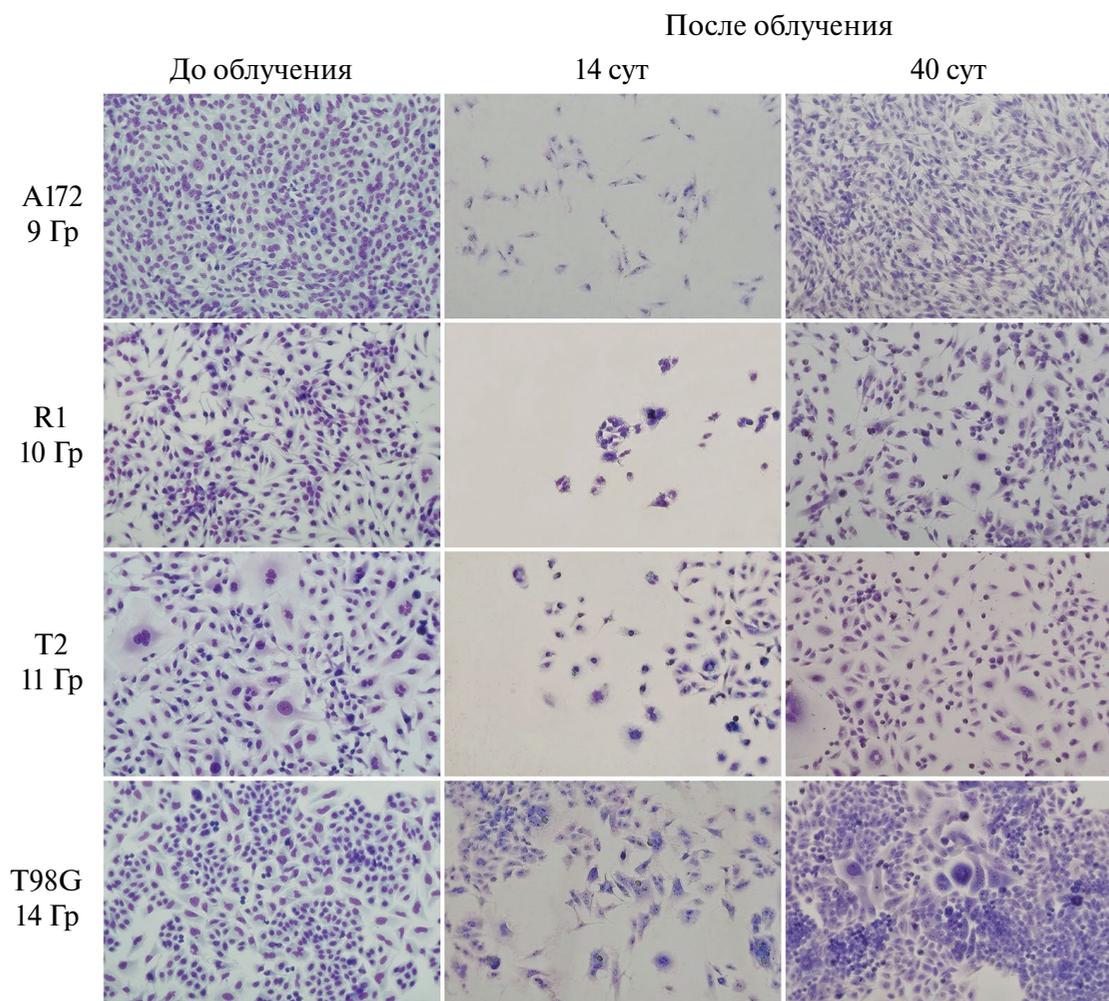
На рис. 4 представлены данные о времени удвоения клеток глиобlastом, облученных в максимальных для каждой линии дозах, при которых высоко резистентные клетки восстанавливали пролиферацию (9 Гр для линии A172, 10 Гр для R1, 11 Гр для T2, 14 Гр для T98G). Время удвоения потомков выживших после облучения резистентных клеток всех линий глиобlastом на 3-ю нед после облучения возрастало по сравнению с интактными

культурами. В ходе дальнейшего культивирования (4—6 нед после облучения) время удвоения клеток линии A172 сокращалось по сравнению с интактными культурами, а клеток линий R1 и T98G — сокращалось, но не восстанавливалось до исходных значений. В ходе длительного культивирования линии T2 время удвоения потомков резистентных к облучению клеток продолжало увеличиваться.

**Морфологический анализ** показал, что в течение двух недель после облучения в культурах глиобlastом, подвергнутых лучевому воздействию, происходила массовая гибель клеток. На рис. 5 представлены интактные клетки глиобlastом и культуры, облученные в максимальных дозах, после которых возобновлялась пролиферация клеток (9 Гр для линии A172, 10 Гр для R1, 11 Гр для T2, 14 Гр для T98G). В культурах A172 и R1 на 14-е сут после облучения сохранялись одиночные клетки, часть которых увеличивалась в размерах по сравнению с интактными клетками. В культурах T2 и T98G наблюдали большее количество выживших клеток, однако облучение также приводило к увеличению их размера и росту числа полиплоидных и многоядерных клеток. Спустя 2—3 нед после воздействия в облученных культурах появлялись клоны одноядерных пролиферирующих клеток, морфология которых



**Рис. 4.** Время удвоения клеток глиобlastом линий A172, R1, T2 и T98G, интактных и облученных в максимальной для каждой линии дозе, при которой высоко резистентные клетки восстанавливали пролиферацию. По горизонтали (вверху) — линия глиобlastомы и доза лучевого воздействия, по вертикали — время удвоения клеток (недели). Данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ).



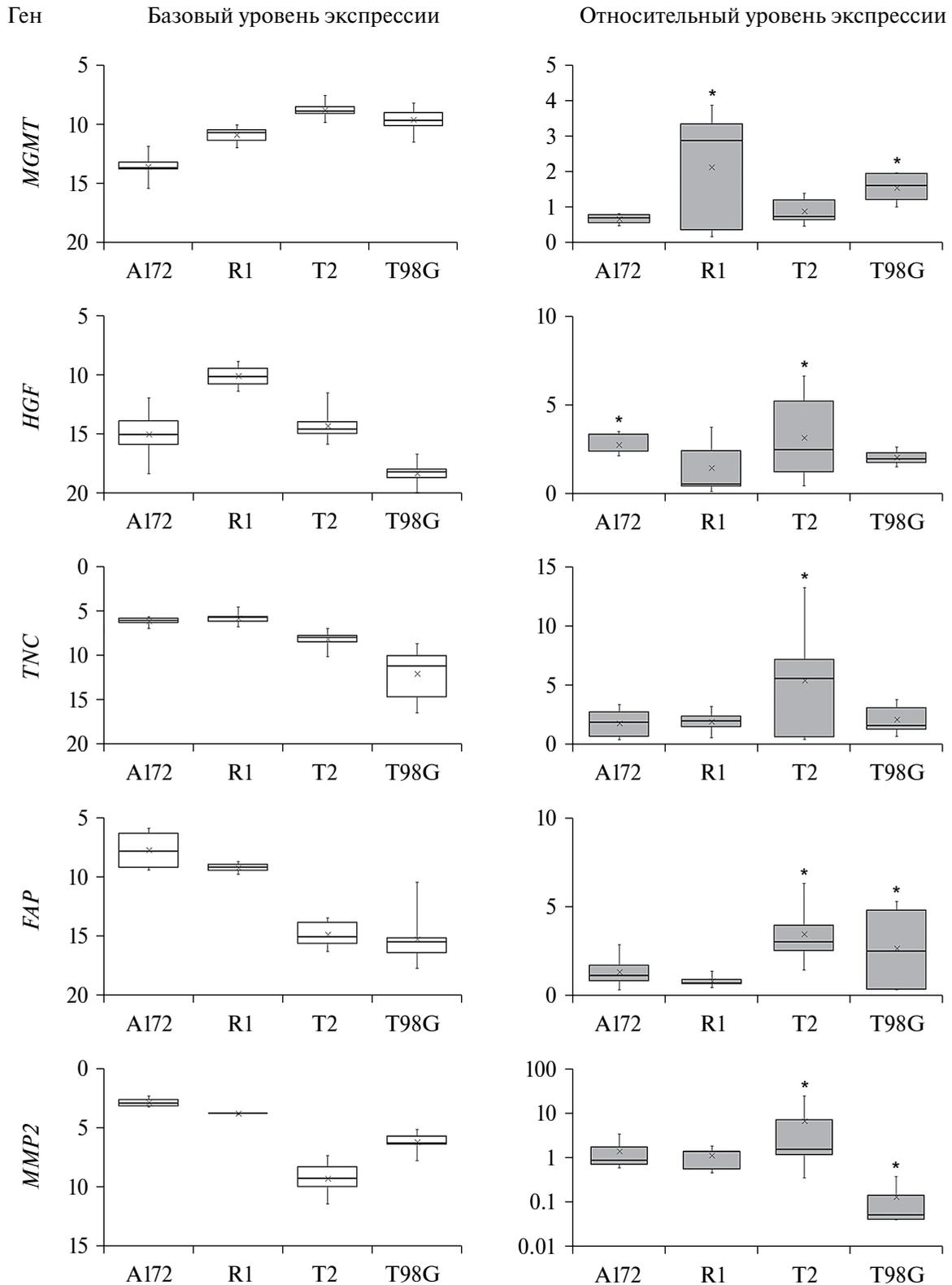
**Рис. 5.** Клетки глиобластом до и после облучения на аппарате гамма-нож. Окраска по Май-Грюнвальду–Гимзе. Объектив 10 $\times$ .

соответствовала интактным клеткам каждой из линий. Эти клетки представляли собой потомков высоко радиорезистентных клеток, за счет пролиферации которых происходило частичное или полное восстановление численности исходных популяций. Спустя 40 сут после облучения морфология клеток глиобластом линий A172, R1 и T2 соответствовала таковой в интактных популяциях. В культурах T98G потомки пролиферирующих клеток были морфологически сходны с интактными клетками, однако число полиплоидных и многоядерных клеток было увеличено по сравнению с интактными культурами.

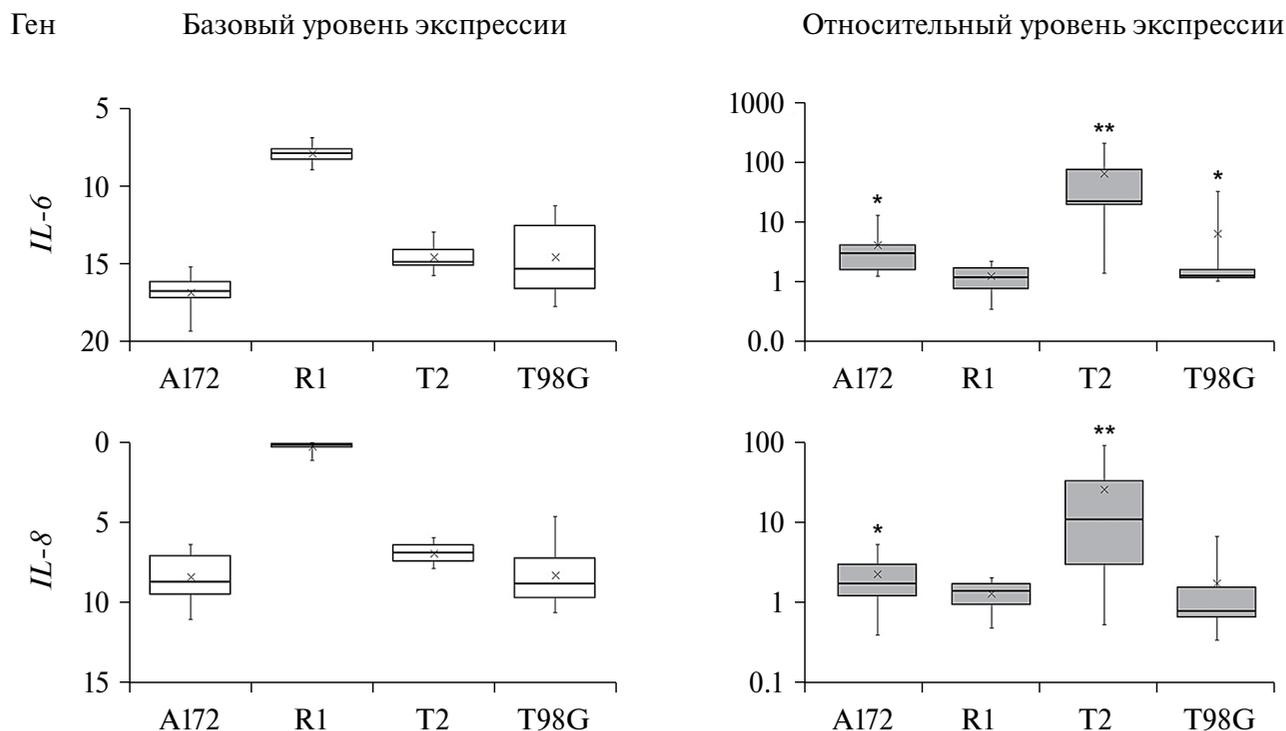
**Профиль экспрессии генов в клетках глиобластом после облучения.** В число исследуемых были включены гены, принимающие участие в формировании резистентности и прогрессии опухолей, а также гены, продукты которых способны модифицировать

микроокружение опухолей. Определяли базовый уровень экспрессии генов в интактных клетках и относительный уровень экспрессии в потомках резистентных клеток, облученных в максимальной для каждой линии дозе, при которой клетки восстанавливали пролиферацию (A172—9 Гр, R1—10 Гр, T2—11 Гр, T98G — 14 Гр).

На рис. 6 представлены уровни активности генов ростовых факторов, белков матрикса и ферментов, которые изменялись в клетках глиобластом после облучения. Активность гена *MGMT*, кодирующего белок, способствующий радиорезистентности клеток за счет репарации вызванных облучением повреждений ДНК, возрастала в потомках резистентных клеток линий R1 и T98G. Активность гена ростового фактора *HGF* возрастала в резистентных клетках линий A172 и T2. Уровень экспрессии гена *TNC*, кодирующего



**Рис. 6.** Активность генов *MGMT*, ростовых факторов (*HGF*), белков матрикса (*FAP*, *TNC*) и ферментов (*MMP2*) в клетках глиобластом. Слева представлен базовый уровень экспрессии в интактных клетках (по вертикали —  $\Delta\text{CT}$ , разница между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPD*); справа — относительный уровень экспрессии в потомках резистентных клеток после облучения (по вертикали —  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ , кратность разницы между экспрессией гена в подвергнутых облучению и интактных клетках): линия — медиана, прямоугольники — Q1, Q3, крест — среднее арифметическое, вертикальные отрезки — максимальное и минимальное значения; — различия достоверны при  $P < 0.05$  (\*).



**Рис. 7.** Активность генов интерлейкинов *IL-6* и *IL-8* в интактных клетках глиобластом (левая колонка) и потомках резистентных клеток глиобластом после облучения (правая колонка). Различия достоверны при  $P < 0.05$  (\*) или  $P < 0.001$  (\*\*). Здесь и на рис. 8–10 объяснения те же, что к рис. 6.

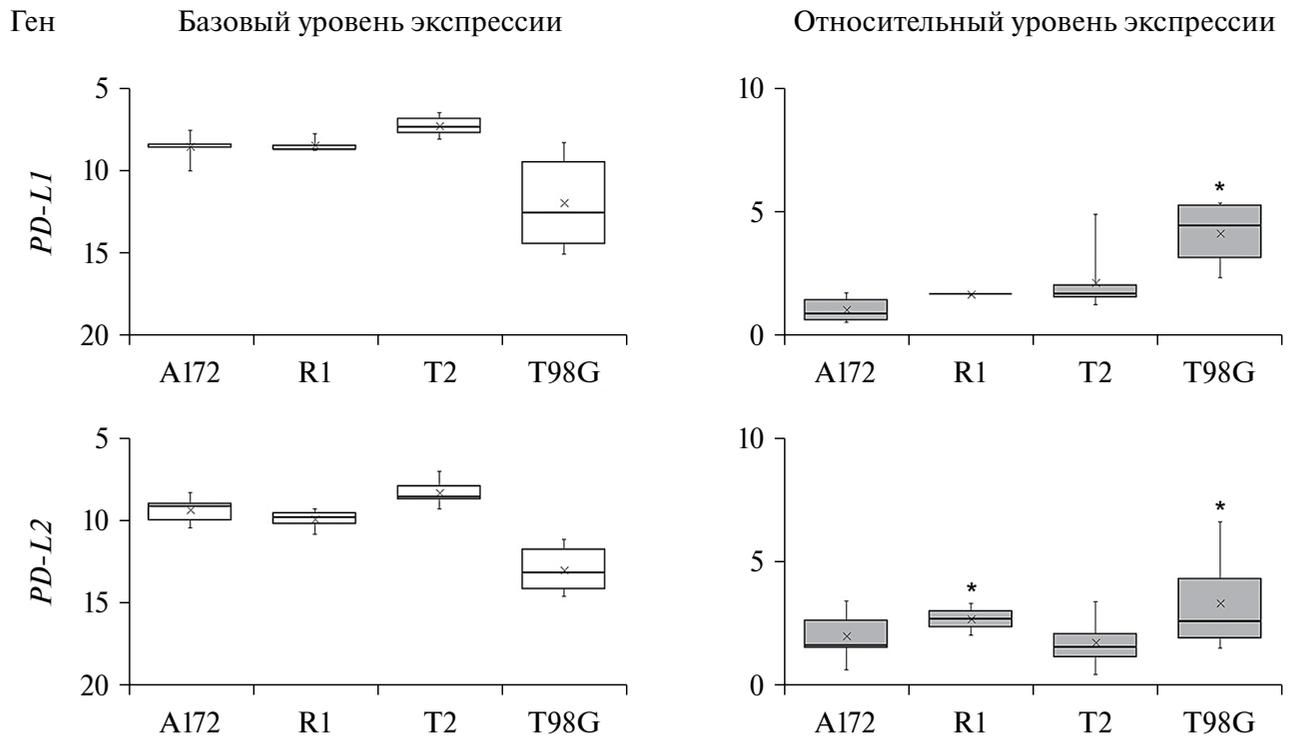
тенацин (белок межклеточного вещества), увеличивался после облучения в клетках линии T2. Перечисленные изменения не коррелировали с базовыми уровнями экспрессии генов. Активность гена *FAP* (белка активации фибробластов) после облучения возрастала в резистентных клетках линий с низким базовым уровнем экспрессии (T2 и T98G) и оставалась неизменной в резистентных клетках линий с высоким базовым уровнем экспрессии (A172 и R1). Активность гена *MMP2* (матриксной металлопротеиназы 2) не менялась в резистентных клетках линий с высоким базовым уровнем экспрессии (A172 и R1), возрастала в радиорезистентных клетках линии T2 и падала в радиорезистентных клетках линии T98G со средним базовым уровнем экспрессии этого гена.

Базовые уровни активности генов, кодирующих интерлейкины *IL-6* и *IL-8*, были на среднем уровне во всех линиях глиобластом кроме R1, где они исходно были высокими (рис. 7). После облучения активность этих генов возрастала в линиях со средними базовыми уровнями экспрессии, причем в линии T2 происходило 60- и 25-кратное усиление активности этих генов.

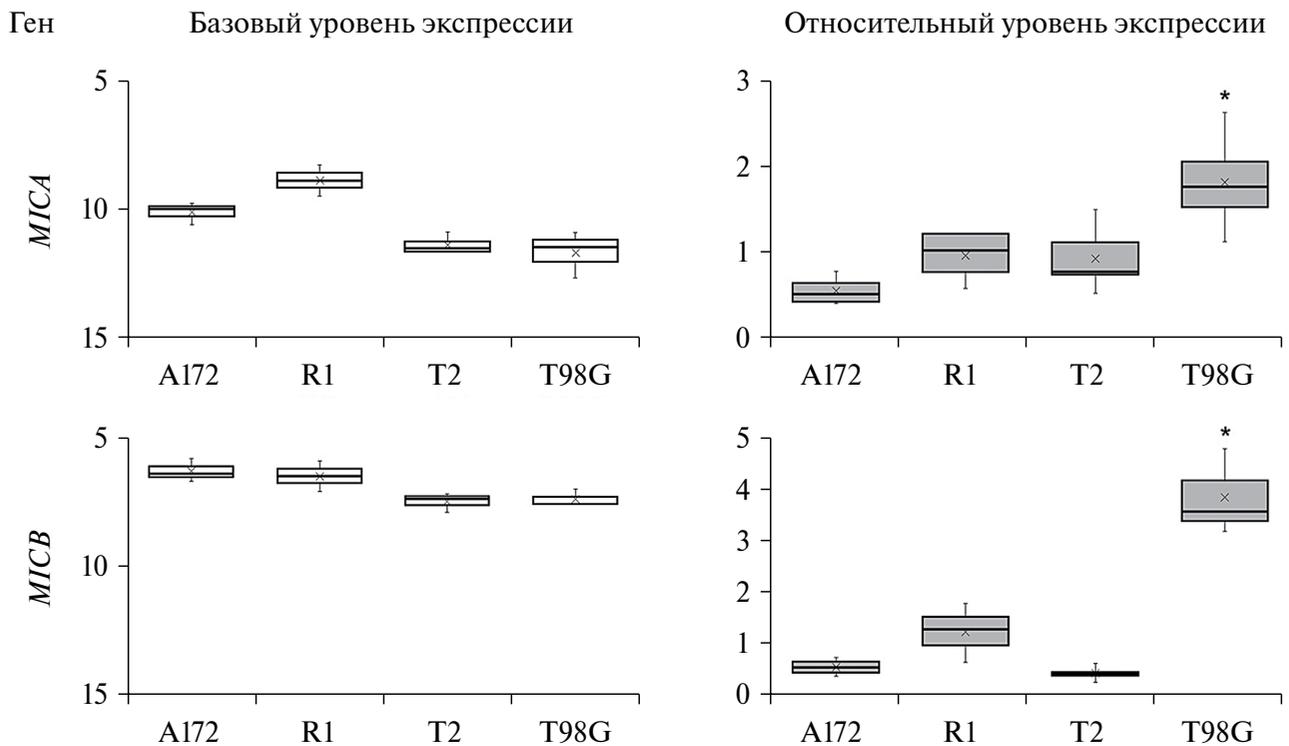
Активность генов лигандов программируемой клеточной гибели *PD-L1* и *PD-L2* была на среднем уровне в интактных клетках всех линий глиобластом, однако в линии T98G она была ниже, чем в остальных (рис. 8). Уровень экспрессии гена *PD-L2* возрастал в потомках резистентных клеток линий R1 и T98G, а гена *PD-L1* — только в потомках резистентных клеток линии T98G.

Базовый уровень экспрессии генов белков *MICA/MICB*, увеличение плотности которых на мембранах опухолевых клеток сопровождается увеличением их чувствительности к цитотоксическому действию естественных киллерных клеток, был на высоком (*MICB*) и среднем (*MICA*) уровне во всех линиях глиобластом (рис. 9). Облучение приводило к усилению активности генов *MICA* и *MICB* в потомках резистентных клеток T98G.

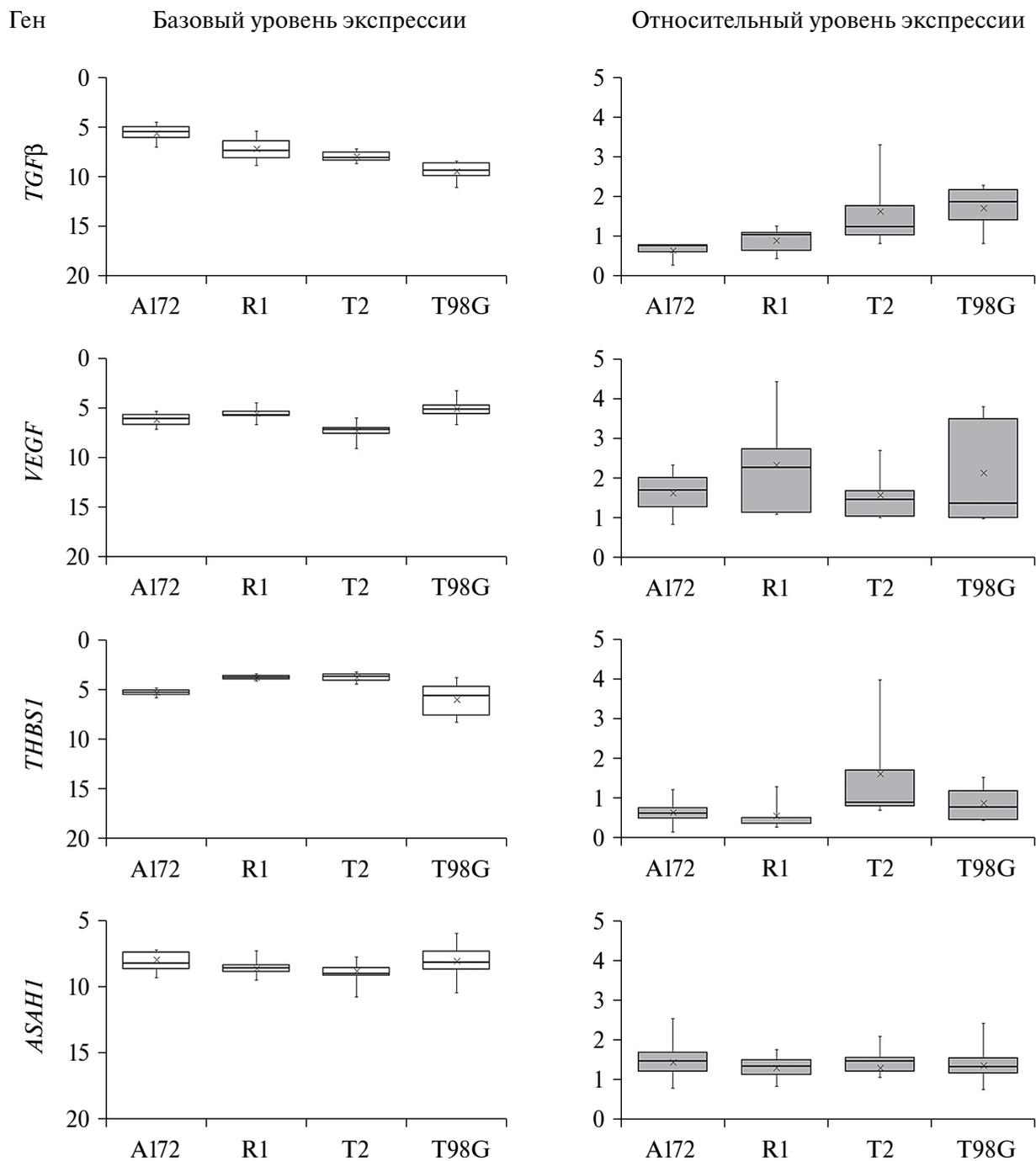
Уровни активности генов ростовых факторов *TGFβ* и *VEFG*, белка межклеточного вещества тромбоспондина (*THBS1*) и фермента кислой церамидазы (*ASAH1*) оставались в потомках резистентных к облучению клеток неизменными по сравнению с интактными клетками глиобластом (рис. 10).



**Рис. 8.** Активность генов лигандов программируемой клеточной гибели (*PD-L1* и *PD-L2*) в интактных клетках глиобластом (левая колонка) и потомках резистентных клеток глиобластом после облучения (правая колонка).



**Рис. 9.** Активность генов *MICA* и *MICB* в интактных клетках глиобластом (левая колонка) и потомках резистентных клеток глиобластом после облучения (правая колонка).



**Рис. 10.** Активность генов ростовых факторов (*TGFβ*, *VEGF*), белков матрикса (*THBS1*) и ферментов (*ASAH1*) в интактных клетках глиобластом (левая колонка) и потомках резистентных клеток глиобластом после облучения (правая колонка).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Невзирая на проводимую агрессивную комбинированную терапию, ключевым этапом которой является радиотерапия, глиобластомы практически всегда рецидивируют. Основными источниками рецидивов считают субпопуляции клеток

глиобластом, которые изначально обладают радиорезистентностью либо приобретают ее в ответ на облучение (Busato et al., 2022; Gu et al., 2022).

Под радиорезистентностью подразумевают способность злокачественных клеток сохранять жизнеспособность и продолжать пролиферировать, несмотря на повреждения ДНК, индуцированные

облучением. Считается, что собственная радиорезистентность глиобластом обусловлена субпопуляцией раковых стволовых клеток, в то время как приобретенную резистентность связывают с уходом от апоптоза и эффективной работой механизмов репарации ДНК в субклонах облученных клеток, включая репарацию двунитевых разрывов (Gu et al., 2022). В связи с этим особый интерес представляет изучение радиорезистентных клеток глиобластом и поиск молекулярных мишеней, которые могут усилить радиочувствительность этих опухолей. В работе были получены и исследованы популяции радиорезистентных клеток глиобластом линий A172, R1, T2 и T98G, разнообразие свойств которых призвано отражать крайнюю гетерогенность вариантов этого заболевания (Reitman et al., 2018).

При моделировании стандартного протокола лечения глиобластом в условиях *in vitro*, как правило, используют фракционированное облучение с мониторингом эффектов в течение последующей недели (Киселева и др., 2018б; Norppmann et al., 2022) или однократное высокодозовое облучение (Smith et al., 2010). Следует отметить, что при использовании фракционированного облучения с низкой мощностью повышается вероятность появления клеток, обладающих приобретенной резистентностью. Аппарат гамма-нож позволяет применять локальное лучевое воздействие в более высоких дозах, чем при фракционированном облучении, однако его использование также не исключает сохранения или появления резистентных клеток, которые могут служить причиной рецидивирования.

Как правило, при изучении радиорезистентности глиобластом *in vitro* применяют дозы облучения до 10 Гр (Kaur et al., 2015), в редких случаях — до 24 Гр (Smith et al., 2010). Ряд авторов постулируют такие дозы как терапевтически нерелевантные и предлагает использовать более низкий диапазон, 2—6 Гр (Alhaddad et al., 2023; Емельянова и др., 2024). Следует отметить, что суммарную дозу, применяемую при лечении глиобластом, устанавливают в зависимости от объема облучаемой ткани. Согласно этому критерию, доза облучения клеточных культур *in vitro*, составляющая 24 Гр, соответствует дозам, применяемым при терапии пациентов с глиобластомами (Smith et al., 2010). Однако количество опухолевых клеток, сохраняющих жизнеспособность после облучения, зависит не только от соотношения дозы облучения и объема

опухоли, но и от индивидуальных свойств каждой опухоли.

Мы применяли лучевое воздействие в диапазоне 4—16 Гр. При получении радиорезистентных клеток глиобластом были использованы максимальные для каждой линии дозы облучения, при которых происходила гибель большинства клеток, но в течение последующего культивирования возобновлялась пролиферация единичных клеток, сохранивших жизнеспособность (9, 10, 11 и 14 Гр для линий A172, R1, T2 и T98G, соответственно).

Следует подчеркнуть, что жизнеспособность опухолевых клеток после облучения принято оценивать в течение не более чем 14 сут последующего культивирования (Емельянова и др., 2024). Мы продемонстрировали, что для оценки жизнеспособности одиночных высокорезистентных клеток глиобластом этот срок является недостаточным. Возобновление устойчивой пролиферации таких клеток, приводившее к частичному или полному восстановлению численности исходных популяций, в ряде случаев происходило через 4 нед после воздействия, то есть вдвое позже, чем ожидается при использовании стандартного протокола наблюдения. Оценка численности опухолевых клеток на поздних (до 40 сут) сроках культивирования после облучения, проведенная в работе, является важным фактором для прогнозирования рецидивов глиобластом.

В радиобиологических исследованиях золотым стандартом при определении количества клеток, способных пролиферировать после лучевых воздействий, является численность КОЕ (Uckun, Song, 1989; Motaln et al., 2015; McKelvey et al., 2022). В исследованных интактных культурах глиобластом число КОЕ составляло от 3.75 % для линии T2 до 47 % для линии A172. Частота КОЕ во всех культурах после облучения в дозах, превышающих полулетальные, составила 4—15 на  $10^6$  облученных клеток. Более того, при дальнейшем увеличении доз облучения вплоть до летальных, частота КОЕ не менялась, хотя возрастал срок от лучевого воздействия до начала формирования колоний. Следовательно, в линиях глиобластом число радиорезистентных клеток, способных восстановить пролиферацию после облучения, являлось постоянным. Число таких клеток не зависело от радиорезистентности исследованных линий, что свидетельствует о том, что общая радиочувствительность глиобластом и наличие в них отдельных высокорезистентных клеток — независимые

показатели, которые необходимо учитывать при планировании стратегии лечения.

В ряде случаев облучение в дозах, превышающих полулетальные, приводило к значительному замедлению скорости пролиферации потомков радиорезистентных клеток. Однако при планировании стратегии лечения необходимо принимать во внимание, что в условиях *in vivo* клетки глиобластом могут более эффективно восстанавливать пролиферацию под действием микроокружения опухоли (Di Cintio et al., 2020), чего не происходит в условиях *in vitro*.

Ранее мы продемонстрировали, что две из четырех исследованных линий (T2 и T98G) обладают высокой устойчивостью к химиопрепаратам фотемустину и темозоломиду, которые используются при терапии глиобластом. После обработки этими препаратами обе линии формировали популяции не пролиферирующих полиплоидных клеток, которые в течение длительного времени после воздействия сохраняли жизнеспособность (Киселева и др., 2018б; Пиневиц и др., 2022). Показано, что облучение клеток глиобластом в сублетальных дозах также способствует отбору таких не пролиферирующих полиплоидных клеток (Kaur et al., 2015; Alhaddad et al., 2023). В дальнейшем они могут подвергаться деполиплоидизации с дальнейшим формированием популяций дочерних диплоидных клеток, которые способны к митотическому делению (Niu et al., 2017). Также они способны выделять факторы, стимулирующие рост опухоли (Weihua et al., 2011; Вартанян и др., 2020).

Проведенный нами морфологический анализ глиобластом продемонстрировал, что облучение приводило к увеличению числа жизнеспособных гигантских не пролиферирующих полиплоидных и многоядерных клеток в линиях T2 и T98G. Кроме того, замечено, что при длительном наблюдении в культурах увеличивалось число потомков наиболее радиорезистентных клеток, способных пролиферировать и морфологически сходных с интактными клетками. Следует отметить, что при облучении линий глиобластом в сублетальных дозах эти изменения проявлялись на поздних сроках культивирования, что подчеркивает значение оценки численности опухолевых клеток спустя месяц и более после облучения. Мы не оценивали вклад полиплоидных клеток в формирование пролиферирующих популяций, однако можно предположить, что они способствуют выживанию

радиорезистентных клеток и стимулируют их пролиферацию за счет секреции ростовых факторов.

Для более успешной терапии глиобластом и предотвращения рецидивирования необходим поиск биомаркеров резистентных клеток, которые могли бы служить терапевтическими мишенями. Одним из способов поиска таких молекулярных биомаркеров является анализ профилей экспрессии генов, кодирующих факторы, способствующие прогрессии и метастазированию опухолей, в интактных и облученных клетках.

Общепризнанным биомаркером в лечении глиобластом признан фермент MGMT, определяющий возможность репарации опухолевыми клетками повреждений ДНК, вызванных действием облучения (Von Deimling et al., 2010) и алкилирующих препаратов (Oldrini et al., 2020). Вопреки ожиданиям, базовый уровень экспрессии MGMT оказался средним и в более радиорезистентных линиях T2 и T98G, и в более радиочувствительной линии R1. Усиление экспрессии MGMT в потомках резистентных к облучению клеток было выявлено в линиях R1 и T98G. Ранее мы продемонстрировали, что обработка глиобластом препаратом первой линии химиотерапии, темозоломидом, приводило к усилению экспрессии MGMT линиями A172 и R1 (Пиневиц и др., 2023) и не влияло на экспрессию MGMT линиями T2 и T98G (Пиневиц и др., 2022). Следовательно, прогностическая ценность этого биомаркера для определения индивидуального режима терапии глиобластом представляется неоднозначной.

Среди генов, кодирующих ростовые факторы, наибольший уровень активности в интактных клетках исследованных линий был показан для гена проангиогенного фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), экспрессию которого связывают с плохим прогнозом у пациентов с глиобластомами (Reardon et al., 2011; Golan-Cancela, Caja, 2024). Однако после облучения активность VEGF в потомках радиорезистентных клеток оставалась на прежнем уровне во всех линиях. Ранее было показано, что фракционированное облучение глиобластом T2 и T98G в суммарной дозе 50 Гр на линейном ускорителе приводило к усилению экспрессии VEGF, наряду с ростом числа не пролиферирующих полиплоидных и многоядерных клеток. Подвергнутые облучению в тех же условиях клетки линий A172 и R1 погибали (Киселева и др., 2018б). Следовательно, высокий уровень экспрессии VEGF не вносил существенного вклада

в жизнеспособность глиобластом, однако сохранялся при полиплоидизации клеток вследствие облучения.

После облучения на гамма-ноже в клетках A172 и T2 также возрастала экспрессия гена фактора роста гепатоцитов (*HGF*), который стимулирует пролиферацию опухолевых клеток (Yamamoto et al., 1997). В интактных клетках этих линий активность *HGF* была на низком уровне. Время удвоения потомков резистентных клеток A172 действительно возрастало по сравнению с интактными клетками, в то время как в потомках резистентных клеток линии T2 после облучения происходило существенное замедление пролиферации. Уровень активности гена трансформирующего фактора роста бета (*TGFβ*), который способствует ангиогенезу и стимулирует миграционную активность клеток глиобластом, был на среднем уровне в интактных клетках исследованных линий и не изменялся после облучения. Из перечисленных генов, кодирующих ростовые факторы, лишь уровень активности *VEGF* может быть рассмотрен в качестве прогностического маркера интактных глиобластом, однако, согласно полученным нами данным, он не коррелировал с радиочувствительностью глиобластом, и облучение не приводило к усилению или ослаблению его экспрессии.

Активность генов, кодирующих белки межклеточного вещества тромбоспондина-1 (*THBS1*) и тенасцина С (*TNC*), являющиеся компонентами метастатической ниши глиобластом (Jayachandran et al., 2014; Brosicke, Faissner, 2015), была на высоком уровне в клетках всех линий, за исключением гена *TNC*, активность которого в T2 и T98G была на среднем уровне. Показано, что *TNC* высоко экспрессируется во всех солидных опухолях, повышает выживаемость опухолевых клеток, приводит к усилению их миграции и способности к инвазии, стимулирует ангиогенез, а также способствует метастазированию и индукции эпителиально-мезенхимного перехода (Xia et al., 2016). Однако по нашим данным, усиление уровня экспрессии *TNC* происходило лишь в потомках резистентных к облучению на гамма-ноже клеток глиобластомы T2.

В наших предыдущих работах было показано, что усиление экспрессии *TNC* происходило в потомках клеток T2 после однократного облучения на линейном ускорителе, фракционированного облучения на линейном ускорителе до достижения суммарной дозы 50 Гр (Киселева и др., 2018б),

а также после обработки химиотерапевтическими препаратами фотемустинном (Киселева и др., 2018а) и темозоломидом (Пиневиц и др., 2022). Можно было бы предположить, что линия T2 ближе к мезенхиному подтипу глиобластом, однако именно в этой линии облучение приводило к существенному торможению скорости пролиферации потомков резистентных клеток и, следовательно, преобладанию в облученных культурах многоядерных и полиплоидных непролиферирующих клеток.

*THBS1* является важным активатором *TGFβ* и ассоциируется в глиобластомах с мезенхимальным подтипом и неблагоприятным прогнозом у пациентов (Qi et al., 2020). В интактных клетках глиобластом активность *THBS1* была на высоком уровне, и облучение на гамма-ноже не оказывало влияния на экспрессию этого гена в потомках радиорезистентных клеток. С одной стороны, этот показатель может быть рассмотрен как маркер всех исследованных линий глиобластом. С другой стороны, отсутствие корреляции между экспрессией *THBS1* и радиочувствительностью клеток глиобластом не позволяет рассматривать этот маркер в качестве прогностического.

В качестве одной из мишеней терапии глиобластом предложен лизосомный фермент кислая церамидаза (*ASAH1*), экспрессия гена которого существенно повышена в клетках этих опухолей и ассоциируется с резистентностью к терапии и более агрессивным течением заболевания (Hawkins et al., 2022). Более того, считается, что экспрессия *ASAH1* повышается после облучения, что позволяет предположить, что этот ген играет существенную роль в обеспечении радиорезистентности глиобластом (Doan et al., 2017). В исследованных нами линиях глиобластом активность *ASAH1* в интактных клетках была на среднем уровне, и облучение не влияло на его активность в потомках резистентных клеток, что позволяет поставить под сомнение прогностическую значимость этого маркера.

Протеаза активированных фибробластов (*FAP*) не экспрессируется большинством клеток взрослого организма и считается потенциальной терапевтической мишенью опухолей головного мозга, где происходит существенное усиление уровня экспрессии *FAP* (Busek et al., 2016). Согласно полученным нами данным, активность *FAP* была на среднем или низком уровне в интактных клетках глиобластом и усиливалась в потомках резистентных клеток линий со слабым базовым уровнем экспрессии (T2 и T98G). Усиление

экспрессии этого гена также было показано после облучения клеток линий T2 и T98G на линейном ускорителе (Киселева и др., 2018б) и обработки фотемустином (Киселева и др., 2018а). Считается, что ген *FAP* ассоциирован с мезенхимным фенотипом глиобластом. Можно предположить, что активация этого гена связана с изменением состава клеточных популяций в линиях T2 и T98G, поскольку облучение приводило к росту числа полиплоидных непролиферирующих клеток среди радиорезистентных.

Последним ферментом, экспрессия которого была исследована в радиорезистентных клетках, была матриксная металлопротеиназа 2 (*MMP2*), которая деградирует компоненты межклеточного вещества, в том числе коллаген и фибронектин, что способствует подвижности и метастазированию опухолевых клеток (Sincéviciute et al., 2018). Активность гена *MMP2* была на высоком уровне во всех исследованных линиях глиобластом, кроме T2, однако облучение приводило к многократному усилению его экспрессии потомками радиорезистентных клеток T2. В то же время в наиболее радиорезистентной линии T98G облучение приводило к уменьшению уровня экспрессии *MMP2* по сравнению с интактными клетками, что ставит под сомнение его прогностическую значимость.

Потенциальными биомаркерами глиобластом могут выступать цитокины IL-6 и IL-8, уровень экспрессии которых связывают со степенью злокачественности заболевания. Известно, что IL-6 и IL-8 активируют опухолевые клетки, способствуют их росту и формированию опухоли-индуцированной иммуносупрессии, а также усиливают резистентность опухолевых клеток к радио- и химиотерапии (Wang et al., 2009; Sharma et al., 2018; Niu et al., 2021).

В интактных клетках глиобластом исследованных нами линий активность генов интерлейкинов была на среднем уровне, за исключением линии R1, для которой был продемонстрирован крайне высокий уровень экспрессии. В потомках резистентных клеток всех линий уровень экспрессии генов интерлейкинов увеличивался, а в T2 — возрастал многократно. Уменьшение активности генов интерлейкинов было ранее показано лишь в линии R1 после обработки темозоломидом (Пиневиц и др., 2023).

Наряду с усилением экспрессии генов интерлейкинов, клетки линий R1 и T2 после облучения

на гамма-ноже секретируют повышенные уровни IL-6 и IL-8 в культуральную среду (Samoilovich et al., 2023). Ранее нами был сделан вывод о том, что уровень секреции интерлейкинов не коррелирует со степенью злокачественности и радиочувствительностью глиобластом, поскольку наиболее и наименее радиорезистентные линии (T98G и A172), демонстрировали одинаково низкий уровень секреции IL-6 и IL-8 после облучения (Samoilovich et al., 2023). Однако оценка уровня экспрессии генов интерлейкинов позволяет рассматривать их в качестве прогностических маркеров.

Белки PD-L1 и PD-L2 являются лигандами рецептора T-лимфоцитов PD1. Связывание этих биомолекул с рецептором приводит к ингибированию цитотоксической реакции T-лимфоцитов, что препятствует реализации противоопухолевых иммунологических реакций (Freeman et al., 2000; Carter et al., 2002; Iwai et al., 2002; Brown et al., 2003). К настоящему моменту разработаны и применяются в терапии ряда опухолей препараты, блокирующие связывание PD-L1 и PD-L2 с рецептором (Chen et al., 2020), однако присутствие этих биомаркеров на резистентных к терапии клетках глиобластом остается неизвестным.

Мы продемонстрировали, что линии глиобластом экспрессировали гены *PD-L1* и *PD-L2* на среднем уровне, причем наименьший уровень экспрессии был показан для наиболее радиорезистентной линии T98G. Уровень экспрессии генов *PD-L1* и *PD-L2* в потомках радиорезистентных клеток линии T98G, облученной на гамма-ноже, возрастал. Облучение на линейном ускорителе и обработка темозоломидом и фотемустином также приводили к усилению экспрессии *PD-L1* и *PD-L2* клетками линии T98G (Pinevich et al., 2023). Полученные данные свидетельствуют в пользу увеличения злокачественности клеток линии T98G вследствие облучения.

Одной из потенциальных мишеней терапии глиобластом являются гликопротеины MICA и MICB, родственные молекулам MHC I класса, но не способные к презентации антигена. Они появляются на мембранах клеток, подвергнутых клеточному стрессу. В частности, показано, что вследствие злокачественной трансформации клетки глиобластом начинают синтезировать молекулы MICA/MICB (Chitadze et al., 2016, Weiss et al., 2018). Увеличение уровня экспрессии MICA/MICB в клетках глиобластом усиливает их чувствительность

к НК-клеткам, что приводит к активации цитотоксических реакций, направленных на уничтожение трансформированных клеток и тем самым заметно сдерживает рост опухоли (Friese et al., 2003). Усиление экспрессии *MICA* и *MICB* было выявлено в потомках радиорезистентных клеток линии T98G.

Общая гетерогенность глиобластом выражается, в том числе в индивидуальном ответе каждой линии на терапевтические воздействия, что значительно затрудняет выбор стратегии лечения пациентов с данным заболеванием. Наибольший вклад в выживание клеток глиобластом после облучения вносят радиорезистентные клетки. Полученные нами радиорезистентные клетки глиобластом демонстрировали индивидуальный ответ на облучение на гамма-ноже. Для резистентных к облучению клеток линии A172 было характерно значительное усиление скорости пролиферации по сравнению с интактными клетками. В то же время эта линия являлась наиболее радиочувствительной.

Потомки радиорезистентных клеток линии R1 демонстрировали усиление экспрессии *MGMT* и *PD-L2*, а интактные клетки этой линии демонстрировали крайне высокий уровень экспрессии генов интерлейкинов, который сохранялся и после облучения. Скорость пролиферации потомков резистентных к облучению клеток линии T2 существенно замедлялась по сравнению с интактными клетками, однако именно в этих клетках происходило усиление активности ряда генов, связанных с прогрессией опухоли, особенно *MMP-2* и интерлейкинов. Наконец, в клетках наиболее радиорезистентной линии T98G после облучения усиливался уровень экспрессии лигандов контролируемой клеточной смерти и MIC-белков.

Полученные данные могут способствовать лучшему пониманию гетерогенности глиобластом и разработке более эффективного лечения данного заболевания.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. акад. А. М. Гранова (Санкт-Петербург) по теме «Изучение резистентных опухолевых клеток на культурах глиобластом при моделировании стереотаксической радиохирургии рецидивирующей глиобластомы».

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все образцы были получены при информированном согласии от пациентов. Исследование было рассмотрено и одобрено этическим комитетом Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. акад. А. М. Гранова (Санкт-Петербург, Россия), протокол № 02-06/2021 от 24.06.2021.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют, что у них нет конфликта интересов.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

М. П. Самойлович: идея работы. А. А. Пиневиц, И. Ю. Крутецкая, М. П. Самойлович: культивирование клеток, морфологические исследования; А. А. Пиневиц, И. Ю. Крутецкая, А. В. Карташев, Л. Н. Киселева, М. П. Самойлович: облучение клеток на аппарате гамма-нож; Н. Л. Вартамян, А. Ю. Столбовая, С. В. Соловьева: выделение РНК, проведение ПЦР; А. А. Пиневиц, Н. Л. Вартамян, М. П. Самойлович: обработка результатов, А. А. Пиневиц, М. П. Самойлович: написание текста, подготовка иллюстраций. Все авторы принимали участие в планировании работы и обсуждении результатов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вартамян Н. Л., Пиневиц А. А., Бодэ И. И., Самойлович М. П. 2020. Полиплоидные гигантские клетки опухоли и их роль в формировании устойчивости к терапевтическим воздействиям. Современная онкология. Т. 22. С. 105. (Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Bode I. I., Samoylovich M. P. 2020. Polyploid giant cancer cells and their role in the formation of resistance to therapeutic treatment. J. Mo. Oncol. V. 22. P. 105).  
<https://doi.org/10.26442/18151434.2020.3.200134>
- Емельянова С. С., Волницкий А. В., Соляник А. М., Чан Н. Х., Гараева Л. А., Пантина Р. А., Грунина М. Н., Путевич Е. Д., Потысьева А. С., Голубев А. М., Бураджов В. С., Верлов Н. А., Нарыжный С. Н., Коневега А. Л., Штамм Т. А. 2024. Новые клеточные линии глиобластом: анализ генетических изменений, оценка чувствительности к радио- и иммунотерапии. Российские нанотехнологии. Т. 19. С. 396. (Emelianova S. S., Volnickiy A. V.,

- Solyanik A. M., Chan N. H., Garaeva L. A., Pantina R. A., Grunina M. N., Putevich E. D., Potysieva A. S., Golubev A. M., Burdakov V. S., Verlov N. A., Naryznyi S. N., Konevega A. L., Shtam T. A.* 2024. New glioblastoma cell lines: analysis of genetic changes, assessment of sensitivity to radio- and immuno-therapy. *Rus. Nanotechnol.* V. 19. P. 396).  
<https://doi.org/10.56304/S1992722324601824>
- Карташев А. В., Киселева Л. Н., Самойлович М. П., Макаров В. Е., Ростовцев Д. М., Понежа Т. Е., Бодэ И. И., Пиневи́ч А. А., Варта́нян Н. Л.* 2021. Устройство для фиксации и позиционирования клеточных культур при прецизионном облучении. Патент на изобретение № 2778859. (*Kartashev A. V., Kiseleva L. N., Samoilovich M. P., Makarov V. E., Rostovtsev D. M., Ponezha T. E., Bode I. I., Pinevich A. A., Vartanyan N. L.* 2021. A device for fixing and positioning cell cultures under precision irradiation. Patent for invention no. 2778859).
- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Варта́нян Н. Л., Пиневи́ч А. А., Самойлович М. П.* 2016. Характеристика клеточных линий A172 и T98G. *Цитология.* Т. 58. № 5. С. 349. (*Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Samoilovich M. P.* 2016. A172 and T98G cell lines characteristics. *Cell Tiss. Biol.* V. 10. P. 341).
- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Варта́нян Н. Л., Пиневи́ч А. А., Самойлович М. П.* 2018а. Действие фотемустина на клетки линий глиобластом человека. *Цитология.* Т. 60. № 1. С. 21. (*Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Samoilovich M. P.* 2018. The effect of fotemustine on human glioblastoma cell lines. *Cell Tiss. Biol.* V. 12. P. 93).
- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Варта́нян Н. Л., Пиневи́ч А. А., Самойлович М. П.* 2018б. Резистентные к действию генотоксических факторов многоядерные клетки в культивируемых линиях глиобластом человека. *Цитология.* Т. 60. № 8. С. 616. (*Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Samoilovich M. P.* 2019. Multinucleated cells resistant to genotoxic factors within human glioblastoma cell lines. *Cell Tiss. Biol.* V. 13. P. 1).  
<https://doi.org/10.7868/S0041377118080052>
- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Варта́нян Н. Л., Пиневи́ч А. А., Филатов М. В., Самойлович М. П.* 2017. Характеристика новых клеточных линий глиобластом человека. *Цитология.* Т. 59. № 10. С. 669. (*Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Filatov M. V., Samoilovich M. P.* 2018. Characterization of new human glioblastoma cell lines. *Cell Tiss. Biol.* V. 12. P. 1).
- Пиневи́ч А. А., Бодэ И. И., Варта́нян Н. Л., Киселева Л. Н., Карташев А. В., Самойлович М. П.* 2022. Клетки глиобластом человека линий T2 и T98G, резистентные к действию темозоломида. *Цитология.* Т. 64. № 2. С. 126. (*Pinevich A. A., Bode I. I., Vartanyan N. L., Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Samoilovich M. P.* 2022. Temozolomide-resistant human T2 and T98G glioblastoma cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 16. P. 339).  
<https://doi.org/10.31857/S0041377122020043>
- Пиневи́ч А. А., Варта́нян Н. Л., Карташев А. В., Киселева Л. Н., Смирнов И. В., Сидорова Ж. Ю., Свитина С. П., Самойлович М. П.* 2023. Ростовские и молекулярные характеристики клеток глиобластом человека линий A172 и R1, резистентных к действию темозоломида. *Цитология.* Т. 65. № 2. С. 131. (*Pinevich A. A., Vartanyan N. L., Kartashev A. V., Kiseleva L. N., Smirnov I. V., Sidorova Z. U., Svitina S. P., Samoilovich M. P.* 2023. Growth and molecular characteristics of temozolomide-resistant human A172 and R1 glioblastoma cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 17. P. 339).  
<https://doi.org/10.31857/S0041377123020086>
- Ali M. Y., Oliva C. R., Noman A. S. M., Allen B. G., Goswami P. S., Zakharia Y., Monga V., Spitz D. R., Buatti J. M., Griguer C. E.* 2020. Radioresistance in glioblastoma and the development of radiosensitizers. *Cancers (Basel).* V. 12. P. 9.  
<https://doi.org/10.3390/cancers12092511>
- Alhaddad L., Chuprov-Netochin R., Pustovalova M., Osipov A. N., Leonov S.* 2023. Polyploid/multinucleated giant and slow-cycling cancer cell enrichment in response to X-ray irradiation of human glioblastoma multiforme cells differing in radioresistance and TP53/PTEN status. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. Art. ID: 1228.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24021228>
- Brösicke N., Faissner A.* 2015. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adh. Migr.* V. 9. P. 131.  
<https://doi.org/10.1080/19336918.2014.1000071>
- Brown J. A., Dorfman D. M., Ma F. R., Sullivan E. L., Munoz O., Wood C. R., Greenfield E. A., Freeman G. J.* 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* V. 170. Art. ID: 1257.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1257>
- Busato F., Khouzai B. E., Mognato M.* 2022. Biological mechanisms to reduce radioresistance and increase the efficacy of radiotherapy: State of the art. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. Art. ID: 10211.  
<https://doi.org/10.3390/ijms231810211>
- Busek P., Balazjova E., Matrasova I., Hilser M., Tomas R., Syrucek M., Zemanova Z., Krepela E., Belacek J., Sedo A.* 2016. Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumour Biol.* V. 37. P. 13961.  
<https://doi.org/10.1007/s13277-016-5274-9>
- Carter L., Fouser L. A., Jussif J., Fitz L., Deng B., Wood C. R., Collins M., Honjo T., Freeman G. J., Carreno B. M.* 2002.

- PD-1: PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.* V. 32. P. 634.  
[https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200203\)32:3<634::AID-IMMU634>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<634::AID-IMMU634>3.0.CO;2-9)
- Chen Y., Pei Y., Luo J., Huang X., Yu J., Meng X.* 2020. Looking for the optimal PD-1/PD-L1 inhibitor in cancer treatment: a comparison in basic structure, function, and clinical practice. *Front. Immunol.* V. 11. Art. ID: 1088.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01088>
- Chitadze G., Lettau M., Luecke S., Wang T., Janssen O., Furst D., Mytilineos J., Wesch D., Oberg H. H., Held-Feindt J., Kabelitz D.* 2016. NKG2D- and T-cell receptor-dependent lysis of malignant glioma cell lines by human gd T cells: Modulation by temozolomide and A disintegrin and metalloproteases 10 and 17 inhibitors. *Oncoimmunol.* V. 5. Art. ID: e1093276  
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1093276>
- Di Cintio F., Dal Bo M., Baboci L., De Mattia E., Polano M., Toffoli G.* 2020. The molecular and microenvironmental landscape of glioblastomas: implications for the novel treatment choices. *Front. Neurosci.* V. 14. Art. ID: 603647.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.603647>
- Doan N. B., Nguyen H. S., Al-Gizawiy M. M., Mueller W. M., Sabbadini R. A., Rand S. D., Connelly J. M., Chitambar C. R., Schmainda K. M., Mirza S. P.* 2017. Acid ceramidase confers radioresistance to glioblastoma cells. *Oncol. Rep.* V. 38. P. 1932.  
<https://doi.org/10.3892/or.2017.5855>
- Eisenbarth D., Wang Y. A.* 2023. Glioblastoma heterogeneity at single cell resolution. *Oncogene.* V. 5. P. 2155.  
<https://doi.org/10.1038/s41388-023-02738-y>
- Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L. J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M. C., Horton H. F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M. R., Carreno B. M., Collins M., Wood C. R., Honjo T.* 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* V. 192. Art. ID: 1027.  
<https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Friese M. A., Platten M., Lutz S. Z., Naumann U., Aulwurm S., Bischof F., Buhning H. J., Dichgans J., Ramnensee H. G., Steinle A., Weller M.* 2003. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res.* V. 63. P. 8996.
- Golan-Cancela I., Caja L.* 2024. The TGF- $\beta$  family in glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* V. 25. Art. ID:1067.  
<https://doi.org/10.3390/ijms25021067>
- Gu J., Mu N., Jia B., Guo Q., Pan L., Zhu M., Zhang W., Zhang K., Li W., Li M., Wei L., Xue X., Zhang Y., Zhang W.* 2022. Targeting radiation-tolerant persister cells as a strategy for inhibiting radioresistance and recurrence in glioblastoma. *Neuro Oncol.* V. 24. P. 1056.  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noab288>
- Hanif F., Muzaffar K., Perveen K., Malhi S. M., Simjee S. U.* 2017. Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* V. 18. P. 3.  
<https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
- Hawkins C. C., Jones A. B., Gordon E. R., Williford S. E., Harsh Y., Ziebro J. K., Landis C. J., Ge S., Crossman D. K., Cooper S. J., Ramanadham S., Doan N., Hjelmeland A. B.* 2022. Targeting acid ceramidase inhibits glioblastoma cell migration through decreased AKT signaling. *Cells.* V. 11. Art. ID: 1873.  
<https://doi.org/10.3390/cells11121873>
- Hoppmann N., Heinig N., Distler U., Kim E., Lennerz V., Krauß Y., Schumann U., Giese A., Tenzer S., Bitar L., Schmidt M. H. H.* 2022. Gamma irradiation triggers immune escape in glioma-propagating cells. *Cancers (Basel).* V. 14. Art. ID: 2728.  
<https://doi.org/10.3390/cancers14112728>
- Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y., Okazaki T., Honjo T., Minato N.* 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PDL1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 99. P. 12293.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.192461099>
- Jayachandran A., Anaka M., Prithviraj P., Hudson C., McKeown S. J., Lo P. H., Vella L. J., Goding C. R., Cebron J., Behren A.* 2014. Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. *Oncotarget.* V. 5. P. 5782.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2164>
- Kaur E., Rajendra J., Jadhav S., Shridhar E., Goda J. S., Moiyadi A., Dutt S.* 2015. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. *Carcinogenesis.* V. 36. P. 685.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgv050>
- Kim J. E., Paek S. H., Chung H. T., Kim D. G., Jung H. W.* 2004. In vitro biological response of malignant glioma cell lines to Gamma Knife irradiation. *J. Korean Neurosurg. Soc.* V. 35. P. 599.
- Livak K. J., Schmittgen T. D.* 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* V. 25. P. 402.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- McKelvey K. J., Hudson A. L., Donaghy H., Stoner S. P., Wheeler H. R., Diakos C. T., Howell V. M.* 2022. Differential effects of radiation fractionation regimens on glioblastoma. *Radiat. Oncol.* V. 17. P. 17.  
<https://doi.org/10.1186/s13014-022-01990-y>

- Motaln H., Koren A., Gruden K., Ramsak Z., Schichor C., Lah T. T.* 2015. Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. *Oncotarget*. V. 6. P. 40998. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5701>
- Niu N., Mercado-Uribe I., Liu J.* 2017. Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*. V. 36. P. 4887. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.72>
- Niu N., Yao J., Bast R. C., Sood A. K., Liu J.* 2021. IL-6 promotes drug resistance through formation of polyploid giant cancer cells and stromal fibroblast reprogramming. *Oncogenesis*. V. 10. P. 65. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00349-4>
- Oldrini B., Vaquero-Siguero N., Mu Q., Kroon P, Zhang Y., Galan-Ganga M., Bao Z., Wang Z., Liu H., Sa J. K., Zhao J., Kim H., Rodriguez-Perales S., Nam D. H., Verhaak R. G.W., Rabadan R., Jiang T., Wang J., Squatrito M.* 2020. MGMT genomic rearrangements contribute to chemotherapy resistance in gliomas. *Nat. Commun.* V. 11. P. 3883. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17717-0>
- Olivier C., Oliver L., Lalier L., Vallette F. M.* 2021. Drug resistance in glioblastoma: the two faces of oxidative stress. *Front. Mol. Biosci.* V. 7. Art. ID: 620677. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.620677>
- Ostrom Q., Kruchko C., Neff C., Firth A., Sherman R.* 2022. The central brain tumor registry of the United States histopathological grouping scheme provides clinically relevant brain and other central nervous system categories for cancer registry data. *J. Registry Manag.* V. 49. P. 139.
- Pinevich A. A., Vartanyan N. L., Kiseleva L. N., Bode I. I., Krutetskaya I. Yu., Kartashev A. V., Makarov V. E., Ponezha T. E., Smirnov I. V., Samoilovich M. P.* 2023. PD-L1 and PD-L2 gene expression in human glioblastoma cells resistant to chemo- and radiotherapy. *Med. Immunol.* V. 25. P. 605. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-PLA-2693>
- Qi C., Lei L., Hu J., Wang G., Liu J., Ou S.* 2020. Thrombospondin-1 is a prognostic biomarker and is correlated with tumor immune microenvironment in glioblastoma. *Oncol. Lett.* V. 21. P. 22. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12283>
- Reardon D. A., Turner S., Peters K. B., Desjardins A., Gururangan S., Sampson J. H., McLendon R. E., Hurdon II J. E., Jones L. W., Kirkpatrick J. P., Friedman A. H., Vredenburgh J. J., Bigner D. D., Friedman H. S.* 2011. A review of VEGF/VEGFR-targeted therapeutics for recurrent glioblastoma. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* V. 9. P. 414. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2011.0038>
- Reitman Z. J., Winkler F., Elia A. E. H.* 2018. New directions in the treatment of glioblastoma. 2018. *Semin. Neurol.* V. 38. P. 50. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1623534>
- Rock K., Mcardle O., Forde P., Dunne M., Fitzpatrick D., O'Neill B., Faul C.* 2012. A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme — the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival? *Br. J. Radiol.* V. 85. Art. ID: e729. <https://doi.org/10.1259/bjr/83796755>
- Sadik Z. H. A., Hanssens P. E. J., Verheul J. B., Beute G. N., Lie S. T., Leenstra S., Ardon H.* 2018. Gamma knife radiosurgery for recurrent gliomas. *J. Neuro Oncol.* V. 140. P. 615. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2988-0>
- Samoilovich M. P., Pinevich A. A., Smirnov I. V., Vartanyan N. L., Krutetskaya I. Yu., Kiseleva L. N., Makarov V. E., Kartashev A. V.* 2023. IL-6 and IL-8 secretion by human glioma cells proliferating after Gamma knife irradiation. *Med. Immunol.* V. 25. P. 581. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IAI-2717>
- Sharma I., Singh A., Siraj F., Saxena S.* 2018. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. *J. Biomed. Sci.* V. 25. P. 62. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0464-y>
- Sinceviciute R., Vaitkiene P., Urbanaviciute R., Steponaitis G., Tamasauskas A., Skiriute D.* 2018. MMP2 is associated with glioma malignancy and patient outcome. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* V. 11. P. 3010. [www.ijcep.com/ISSN:1936-2625/IJCEP0076346](http://www.ijcep.com/ISSN:1936-2625/IJCEP0076346)
- Smith R., Smith K. A., Biggs C. A., Scheck A. C.* 2010. In vitro biological dosimeter modeling of the glioblastoma response to radiation delivered by the Gamma Knife. Laboratory investigation. *J. Neurosurg.* V. 112. P. 222. <https://doi.org/10.3171/2010.8.GKS10716>
- Sun Y., Liu P., Wang Z., Zhang H., Xu Y., Hu S., Yan Y.* 2024. Efficacy and indications of gamma knife radiosurgery for recurrent low- and high-grade glioma. *BMC Cancer.* V. 24. P. 37. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11772-8>
- Tang Z., Dokic I., Knoll M., Ciamarone F., Schwager C., Klein C., Cebulla G., Hoffmann D. C., Schlegel J., Seidel P., Rutenberg C., Brons S., Herold-Mende C., Wick W., Debus J., Lemke D., Abdollahi A.* 2022. Radioresistance and transcriptional reprogramming of invasive glioblastoma cells. *Internat. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* V. 112. P. 499. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2021.09.017>
- Thakkar J. P., Dolecek T. A., Horbinski C., Ostrom Q. T., Lightner D. D., Barnholtz-Sloan J. S., Villano J. L.* 2014. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* V. 23. P. 1985. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>

- Uckun F. M., Song C. W.* 1989. Radiobiological features of human pluripotent bone marrow progenitor cells (CFU-GEMM). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* V. 17. P. 1021. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(89\)90150-8](https://doi.org/10.1016/0360-3016(89)90150-8)
- Valerio J. E., Wolf A. L., Mantilla-Farfan P., Aguirre Vera G. D. J., Fernandez-Gomez M. P., Alvarez-Pinzon A. M.* 2024. Efficacy and cognitive outcomes of Gamma Knife radiosurgery in glioblastoma management for elderly patients. *J. Pers. Med.* V. 14. Art. ID: 1049. <https://doi.org/10.3390/jpm14101049>
- Vilar J. B., Christmann M., Tomicic M. T.* 2022. Alterations in molecular profiles affecting glioblastoma resistance to radiochemotherapy: Where does the good go? *Cancers (Basel)*. V. 14. Art. ID: 2416. <https://doi.org/10.3390/cancers14102416>
- Von Deimling A., Korshunov A., Hartmann C.* 2010. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol.* V. 21. P. 74. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00454.x>
- Wang H., Lathia J. D., Wu Q., Wang J., Li Z., Heddleston J. M., Eylar C. E., Elderbroom J., Gallagher J., Schuschu J., MacSwords J., Cao Y., McLendon R. E., Wang X. F., Hjelmeland A. B., Rich J. N.* 2009. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells*. V. 27. P. 2393. <https://doi.org/10.1002/stem.188>
- Weihua Z., Lin Q., Ramoth A. J., Fan D., Fidler I. J.* 2011. Formation of solid tumors by a single multinucleated cancer cell. *Cancer*. V. 117. P. 4092. <https://doi.org/10.1002/cncr.26021>
- Weiss T., Schneider H., Silginer M., Steinle A., Pruschy M., Polic B., Weller M., Roth P.* 2018. NKG2D-Dependent antitumor effects of chemotherapy and radiotherapy against glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* V. 24. P. 882. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1766>
- Xia S., Lal B., Tung B., Wang S., Goodwin C. R., Lathera J.* 2016. Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. *Neuro Oncol.* V. 18. P. 507. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov171>
- Yamamoto S., Wakimoto H., Aoyagi M., Hirakawa K., Hamada H.* 1997. Modulation of motility and proliferation of glioma cells by hepatocyte growth factor. *Jpn. J. Cancer Res.* V. 88. P. 564. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1997.tb00420.x>

## PROPERTIES OF A172, R1, T2, AND T98G GLIOBLASTOMA CELLS' DESCENDANTS SURVIVING AFTER GAMMA KNIFE IRRADIATION

A. Pinevich<sup>a, b, \*</sup>, I. Yu. Krutetskaya<sup>a</sup>, N. L. Vartanyan<sup>a</sup>, A. Yu. Stolbovaya<sup>a</sup>, S. V. Solovieva<sup>b</sup>,  
A. V. Kartashev<sup>a</sup>, L. N. Kiseleva<sup>a</sup>, M. P. Samoilovich<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, 197758, Russia

<sup>b</sup> Saint Petersburg State University, Cytology and Histology Department, Saint Petersburg, 199034, Russia

\*e-mail: [agniapinevich@gmail.com](mailto:agniapinevich@gmail.com)

**Objectives:** A key problem in the treatment of patients with glioblastomas is the development of recurrences formed by the descendants of resistant cells that survive after radio and/or chemotherapy. Gamma Knife allows a single high-dose tumor irradiation, which reduces the probability of formation of resistant cells due to long-term radiation therapy with fractionated irradiation, but does not exclude the preservation of single initially resistant cells. The aim of the work was to obtain and study the properties of radioresistant descendants of human A172, R1, T2, and T98G glioblastoma cells, which resumed proliferation after Gamma Knife irradiation. **Materials and methods:** To conduct the study, a device was developed for fixing and positioning cell cultures under precision irradiation. **Results and discussion:** The radiation doses, after which single highly resistant cells resumed proliferation, were 9 Gy (A172), 10 Gy (R1), 11 Gy (T2), and 14 Gy (T98G). The resumption of stable proliferation of descendants of radioresistant cells occurred 14–28 days after irradiation, which is twice as long as the generally accepted time for assessing the viability of tumor cells after irradiation. The CFU number was of the same order and remained unchanged for all glioblastoma lines in a wide range of doses starting from medial lethal radiation doses. A search was conducted for potential molecular biomarkers for glioblastoma therapy. It was shown that the genes encoding interleukins IL-6 and IL-8 had potential prognostic significance, while the prognostic value of the expression of *MGMT*, *VEGF*, *HGF*, *TNC*, *THBS1*, *ASAHI*, *FAP*, *MMP2*, *PD-L1*, and *PD-L2* seemed ambiguous, since the radioresistant cells of the studied glioblastoma lines demonstrated individual response to Gamma Knife radiation, regardless of their radio sensitivity. **Conclusion:** The results obtained contribute to the understanding of glioblastoma heterogeneity and to a more effective development of treatment protocols.

**Keywords:** glioblastoma, A172, R1, T2, T98G, irradiation, Gamma Knife, radioresistant cells, CFU, IL-6, IL-8