



Федулов А.С.¹, Боровский А.А.¹✉, Давидян А.В.¹, Шамкалович А.В.¹, Веевник Д.П.²

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Молекулярно-генетические аспекты развития и прогрессии глиом. Обзор литературы

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция исследования – Федулов А.С., Боровский А.А.; обзор литературы – Боровский А.А., Давидян А.В., Веевник Д.П., Шамкалович А.В.; написание текста – Боровский А.А., Федулов А.С., Давидян А.В., Шамкалович А.В.; редактирование – Боровский А.А., Федулов А.С., Шамкалович А.В., Веевник Д.П.

Подана: 16.09.2022

Принята: 29.09.2022

Контакты: alexabor@mail.ru

Резюме

Злокачественные глиомы – наиболее распространенные и опасные первично-мозговые опухоли у взрослых. Причиной неблагоприятного исхода у пациентов становится рецидивирование опухоли, которая приобретает способность уклоняться от терапевтического воздействия. Актуально формирование новой стратегии разработки методов лечения, направленных именно на резистентные клетки. Недавние геномные исследования раскрыли сложную гетерогенность глиом и позволили по-новому взглянуть на геномный ландшафт опухолевых клеток, которые выживают на фоне проводимого лечения и инициируют рецидив опухоли. Резистентные клетки также обладают свойствами стволовых клеток; по этой причине предложено называть их рецидивиницирующими стволовыми клетками (РИСК). Генетические изменения и перепрограммирование генома лежат в основе врожденной адаптивной резистентности РИСК. В целях предотвращения рецидива опухоли терапевтическое воздействие необходимо направить в том числе на данную субпопуляцию клеток.

Ключевые слова: глиома, геном, резистентность, рецидив, внутриопухолевая гетерогенность



Fedulov A.¹, Borovsky A.¹✉, Davidian A.¹, Shamkalovich A.¹, Veevnik D.²

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Molecular Genetic Aspects of Gliomas Development and Progression: A Literature Review

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept – Fedulov A., Borovsky A.; literature review – Borovsky A., Davidian A., Veevnik D., Shamkalovich A.; text writing – Borovsky A., Fedulov A., Davidian A., Shamkalovich A.; editing – Borovsky A., Fedulov A., Shamkalovich A., Veevnik D.

Submitted: 16.09.2022

Accepted: 29.09.2022

Contacts: alexabor@mail.ru

Abstract

Malignant gliomas are the most common and dangerous primary brain tumors in adults. The cause of unfavorable outcomes in patients is the recurrence of the tumor, which acquires the ability to evade therapeutic effects. A new strategy for developing therapies targeting resistant cells is relevant. Recent genomic studies revealed a complex heterogeneity of gliomas and provided new insights into the genomic landscape of tumor cells surviving existing treatments and initiating tumor recurrence. Resistant cells also possess properties of stem cells; for this reason, it has been proposed to name them recurrence-initiating stem-like cancer (RISC). Genetic changes and genome reprogramming underlie the innate adaptive resistance of RISC cells. In order to prevent tumor recurrence, the therapeutic effect should be aimed, among other things, toward this cell subpopulation.

Keywords: glioma, genome, resistance, recurrence, intratumoral heterogeneity

■ ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее актуальных и сложных вызовов в нейрохирургии в настоящее время остается лечение глиальных опухолей головного мозга. Злокачественные глиомы являются третьей по частоте причиной смерти от новообразований в группе молодых людей в возрасте до 35 лет. Несмотря на очевидные успехи нейроонкологии последних лет в области молекулярно-генетических исследований, применение всех возможных методов элиминации злокачественных глиом, значительный прогресс в лечении данной тяжелой патологии не достигнут [1–5]. Основным критерием, ограничивающим эффективность применения метода лечения глиом, являются биологическая природа опухоли и особенности головного мозга. Около 50% глиом относятся к высокозлокачественным. Одним из основных методов лечения в нейроонкологии является хирургический. Однако основной принцип хирургического лечения, а именно анатомический или блоковый характер резекции, в нейроонкологии неприменим. Радикальная операция в случае злокачественной глиомы невозможна, поскольку опухолевые клетки диссеминированы в тканях головного мозга на расстоянии нескольких сантиметров и более от опухолевого очага. Глиомы, даже высокозлокачественные, не метастазируют [6], тем не менее поскольку головной

мозг является забарьерным органом, опухоль недостижима для иммунной системы организма и большинства химиопрепаратов, по крайней мере на ранних стадиях, когда еще возможна ее элиминация [7]. Раскрытие механизмов канцерогенеза глиом актуально и необходимо для развития эффективных методов лечения [8].

■ КРИТЕРИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ГЛИОМ

Знание ключевых вопросов канцерогенеза глиом, очевидно, необходимо для создания новых методов комплексной терапии, но, что не менее важно, это нужно для прогнозирования динамики опухолевого роста и клинического исхода заболевания [8].

Прогноз в отношении жизни пациента – это главный и первичный критерий злокачественности опухоли. В реальной клинической ситуации онколог для определения прогноза заболевания, соответственно для определения степени злокачественности опухоли и выбора тактики лечения, применяет ряд вторичных, косвенных признаков благоприятного или неблагоприятного прогноза у пациента с опухолью [9].

Самый первый этап определения степени злокачественности опухоли у онкологического пациента – использование макроскопических критериев, объединенных в систему международной классификации стадий злокачественных новообразований TNM. Классификация TNM рутинно используется в общей онкологии, однако неприменима в случае глиальных опухолей. Этому есть ряд причин, связанных с физиологическими особенностями головного мозга и биологической природой глиом. В системе TNM определено, что согласно критерию T (распространенность первичной опухоли) опухоли малого размера, не выходящие за пределы органа, из которого они происходят, относятся к доброкачественным и имеют благоприятный прогноз. В случае с глиомой прямой связи между размером, характером роста опухоли и прогнозом нет. Так, глиобластома (опухоль с крайне неблагоприятным прогнозом) макроскопически (по данным КТ, МРТ или интраоперационно) может быть представлена небольшим узлом с ровными контурами. В то же время относительно доброкачественная пилоцитарная астроцитома часто занимает несколько долей головного мозга и не имеет четких границ. Критерий N системы TNM (отсутствие, наличие и распространенность метастазов в регионарных лимфатических узлах) в нейроонкологии неприменим по причине отсутствия развитой лимфатической системы в головном мозге. Глиомы не метастазируют, соответственно критерий M также не используется [9].

Следующий уровень определения степени злокачественности опухоли – гистологический. Градация низкоккачественных (LGG) и высококкачественных (HGG) глиом изначально основывается на выявлении признаков клеточно-ядерного полиморфизма и степени сосудистой гиперплазии, наличия некроза в ткани опухоли. Однако не всегда возможно, основываясь на выраженности неоплазии сосудов, предположить скорость и степень малигнизации всего широкого спектра глиом, в особенности LGG [10]. В итоге сам по себе патогистологический диагноз не является единственно определяющим в прогнозировании динамики опухолевого роста и клинического исхода заболевания.

В дополнение к патогистологическому исследованию разрабатываются технологии патогистохимии, верификации молекулярно-генетических изменений и взаимодействия генов-супрессоров, онкогенов, факторов роста и ферментных систем



в целях уточнения механизмов онкогенеза, устойчивости клеток опухоли к лечению, механизмов клеточного восстановления для разработки новых терапевтических формул, основанных на данных молекулярной биологии. Так, нарушение работы подавляющего рост опухоли гена p53, обнаруженного на хромосоме 17p, часто связано с неблагоприятным прогнозом течения онкологического заболевания. Опухоли, содержащие значительный процент клеток с мутацией p53, растут значительно быстрее, рецидивируют чаще и наиболее устойчивы к терапии [8]. Изменения на хромосоме 17p характерны именно для глиом, в том числе и LGG. Чем выше степень малигнизации глиальных опухолей, тем больше генных мутаций выявляется, включая изменения на хромосомах 9p, 19q, 4, 7 и 13. Мутация на хромосомах 9p, 19q характерна для олигодендроглиом и коррелирует с более благоприятным прогнозом. В настоящее время установлено, что экспрессия фактора роста эндотелия сосудов и плотность микрососудов являются независимыми маркерами прогнозирования выживаемости пациентов с глиомами и соответствуют неблагоприятному прогнозу. Изменения на 10-й хромосоме характерны примерно для 50% мультиформных глиобластом. Ген PTEN, расположенный на хромосоме 10q23, недавно верифицирован в качестве предполагаемого опухолевого гена-супрессора. Мутации PTEN обнаруживаются при HGG у взрослых преимущественно пожилого возраста. Потеря 10-й хромосомы напрямую коррелирует с амплификацией рецепторов эпидермального фактора роста, что взаимосвязано с высокой степенью вероятности неблагоприятного исхода и может быть целью терапевтического воздействия [11].

■ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛИОМЫ И СТРАТЕГИЯ ТЕРАПИИ

Изучение механизмов канцерогенеза глиом помимо прогнозирования клинического исхода заболевания необходимо для создания новых подходов к лечению, а также к преодолению резистентности опухоли к существующим методам комплексной терапии.

Пациенты с глиомой в большинстве случаев умирают по причине рецидивирования опухоли, которая эволюционирует и становится устойчивой к терапии. Для разработки будущих методов лечения необходима новая стратегия, нацеленная на устойчивые клетки опухоли.

Наиболее агрессивным представителем глиом является мультиформная глиобластома (МГБ). Недавние исследования генома обнаружили сложную гетерогенность опухолевых клеток в глиобластоме. Раскрывается геномный ландшафт опухолевых клеток, которые несмотря на лечение выживают и инициируют рецидив опухоли. Поведение устойчивых клеток опухоли напоминает поведение стволовых клеток. Для этих клеток в литературе предложено название – рецидивиницирующие стволовые клетки (РИСК) (recurrence-initiating stem-like cancer (RISC)). В основе адаптивной резистентности клеток РИСК лежат генетические изменения и геномное перепрограммирование [12].

Средняя продолжительность жизни пациента с МГБ при комплексном лечении составляет приблизительно 15 месяцев [1, 7]. Стандартная терапия для МГБ включает максимально безопасную хирургическую резекцию, за которой следует лучевая и химиотерапия [13, 14]. Несмотря на то, что большинство глиальных опухолей первоначально реагируют на эти методы лечения, в дальнейшем опухоль неизбежно рецидивирует, после чего выживаемость пациентов составляет около 6 месяцев.

Использование персонализированной (таргетной) терапии, направленной против молекулярных мишеней, отвечающих за рост основной массы первичной опухоли, по данным клинических испытаний [15, 16], до сих пор также не увенчалось успехом, что требует развития концептуально новых подходов.

■ ПРОБЛЕМА РЕЦИДИВИРОВАНИЯ ГЛИОМ

Рецидив глиобластомы проявляется локально, вокруг полости, оставшейся после хирургического удаления опухоли, при этом отсутствуют сведения о метастазировании опухоли в другие органы [17]. Следовательно, невозможность локального контроля роста опухоли в области первичной ее локализации является основной причиной смерти пациентов.

Пациенты с МГБ имеют плохой прогноз по причине того, что опухолевые клетки, которые выживают после первоначальной терапии, вызывают рецидив опухоли. С учетом того факта, что неоднородность опухолей является важной причиной неудач традиционной и молекулярно-таргетной терапии [18], важно определить и охарактеризовать типы клеток опухоли, которые смогут обойти терапию и стать рецидивизирующими опухолевыми клетками. Таргетная терапия должна воздействовать именно на эти популяции клеток. Новые знания, полученные в результате изучения генетической эволюции популяций опухолевых клеток в ответ на терапию, а также их способность принимать свойства стволовых клеток предоставили новые возможности для решения этой важной задачи.

■ ВНУТРИОПУХОЛЕВАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ В ГЛИОМЕ

Последние достижения геномного анализа показали огромное разнообразие генетических и эпигенетических изменений, различные профили экспрессии генов в глиобластоме [19]. От особенности клетки-предшественницы в дальнейшем может зависеть внутриопухолевая гетерогенность [20]. Клеткой-предшественницей может стать нервная стволовая клетка, однако в качестве клеток-предшественниц МГБ предполагались даже зрелые астроциты и нейроны. Специфический фенотип опухоли может зависеть также и от последовательных генетических и эпигенетических изменений этих клеток (рис. 1, А), однако понимание данных вопросов сформировано еще не полностью. Механизмы канцерогенеза в различных подгруппах МГБ постепенно проясняются, особенно в тех случаях, где имеется мутация в гене изоцитратдегидрогеназы (IDH) [21]. Глиомы, которые переносят мутации ферментов IDH1/2, продуцируют избыточное количество гидроксиглутарата (2-HG), что мешает функционированию нескольких эпигенетических ферментов и приводит к геномному перепрограммированию. Специфическая терапия в подгруппах должна быть реализована на основе знания о конечном биологическом фенотипе, который объединяет все источники гетерогенности опухоли. Например, препараты, которые ингибируют эпигенетические модификаторы, могут перепрограммировать геномы глиом с мутацией фермента IDH1/2 [22], в то время как использование темозоломида в таких опухолях необходимо будет пересмотреть, поскольку он вызывает гипермутацию и приводит к еще большему изменению фенотипа [23, 24, 12].

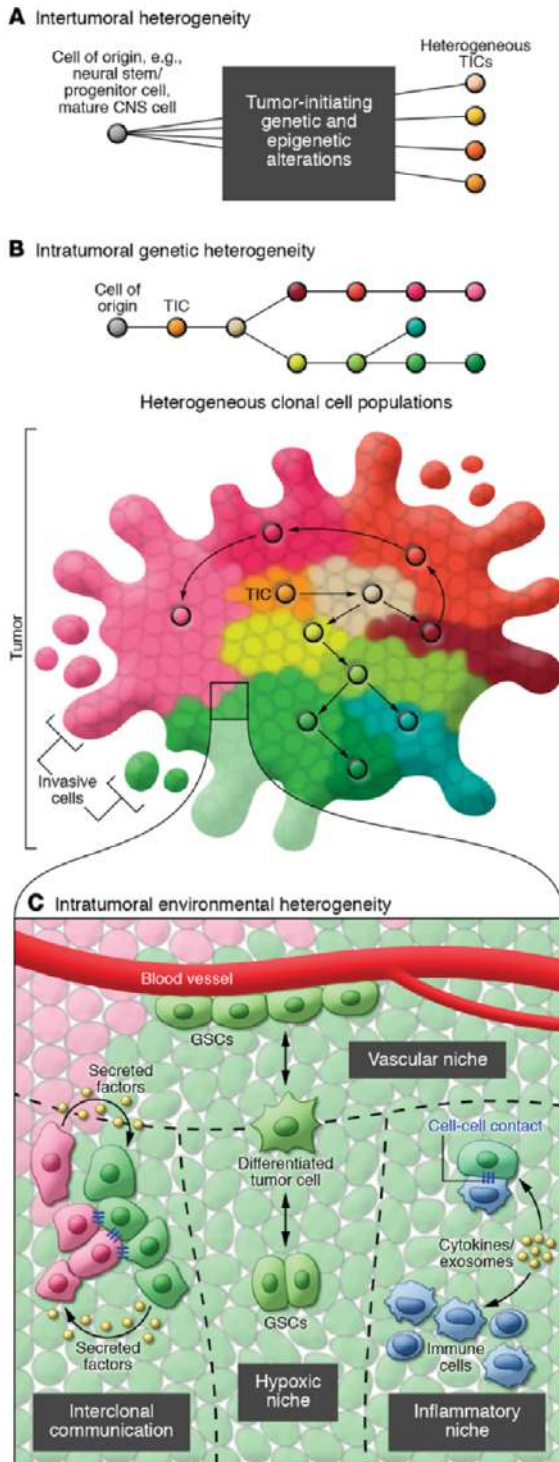


Рис. 1. Схематичное строение глиобластомы (Satoru Osuka, Erwin G. Van Meir с изменениями):
A – формирование неоднородной популяции опухолиндуцирующих клеток из клетки-предшественницы путем генетических и эпигенетических изменений в процессе ее деления;
B – опухолиндуцирующие клетки делятся и формируют генетически расходящиеся клональные клеточные популяции. Во время этого процесса клональной эволюции клеточное потомство приобретает разнообразные генетические изменения и порождает множество клонов. Клетки с подобными типами генетических изменений существуют в непосредственной пространственной близости;
C – дополнительная гетерогенность на клеточном уровне обусловлена влиянием факторов окружающей микросреды. Близость к кровеносным сосудам (сосудистые и гипоксические ниши), паракринные сигналы между опухолевыми клетками и иммунными реакциями (воспалительные) оказывают влияние на индивидуальную биологию опухолевых клеток
Fig. 1. Schematic structure of glioblastoma (Satoru Osuka, Erwin G. Van Meir with modifications):
A – formation of heterogeneous population of tumor-inducing cells from a progenitor cell by genetic and epigenetic changes during cell division;
B – tumor-inducing cells divide and form genetically divergent clonal cell populations. During this process of clonal evolution, the cellular progeny acquire a variety of genetic changes and give rise to many clones. Cells with similar types of genetic changes exist in close spatial proximity;
C – additional heterogeneity at the cellular level is due to the influence of microenvironmental factors. Proximity to blood vessels (vascular and hypoxic niches), paracrine signals between tumor cells, and immune responses (inflammatory) influence individual tumor cell biology

■ КЛОНАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК – ПРИЧИНА ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ

Патогистологический анализ МГБ свидетельствует об обширной внутриопухолевой неоднородности, в том числе о наличии некроза различной степени выраженности (иногда с перинекротическими псевдопалисадными клетками), внутриопухолевых кровоизлияний и тромбоза, клубочковой микрососудистой пролиферации и полиморфизма опухолевых клеток. Иммуногистохимические и молекулярно-биологические исследования также выявляют неоднородные паттерны экспрессии опухолевых маркеров и неравномерное распределение клеток с различными генетическими изменениями [25]. Тем не менее вся сложность внутриопухолевой неоднородности остается до конца непонятной из-за ограничений у имеющихся в настоящее время методов исследования, которые не способны отслеживать различные популяции опухолевых клеток внутри опухолевой массы. Анализ генома отдельных участков в одной и той же опухоли, взятых во время операции, показал сосуществование многочисленных клонов, содержащих различные генетические изменения. Изучение сегрегированных на основе наличия независимых или общих мутаций клонов приблизило к пониманию процесса развития опухоли [12, 23–27].

Модель клональной эволюции утверждает, что образование опухоли инициируется в клетке-предшественнице, затем следует накопление одиночных или множественных генетических изменений, дающих преимущества в росте и выживании [28]. Знания, полученные при изучении генетических синдромов [29], а также полногеномный поиск ассоциаций (GWAS – Genome-Wide Association Studies) [30] показали, что наследственный генетический компонент может ускорить этот процесс. Некоторые подобные популяции клеток, вероятно, дают начало опухолевым клонам, однако прямых доказательств этого процесса в МГБ человека мало по причине недостатка сведений о ранних этапах трансформации клеток мозга. Генетические изменения в ранних трансформированных клетках могут впоследствии приводить к появлению множества клонов при избирательном влиянии эволюционной экосистемы в опухоли [12, 23–27]. Пространственное расположение клеток в опухоли связано с ее геномным профилем, клоны с похожими типами генетических изменений, как правило, пространственно расположены рядом (рис. 1, Б) [31, 25, 27].

Высокая способность к инвазии является одной из определяющих особенностей глиомы, и этот процесс усложняет строение опухоли. Часть опухолевых клеток выходит на периферию опухолевой массы и диффузно проникает в нормальную паренхиму головного мозга [32]. Глубоко проникшие опухолевые клетки с большей вероятностью выживают после хирургического вмешательства, возможно, эта клеточная популяция является более устойчивой к лечению и инициирует рецидив опухоли.

■ ВНУТРИОПУХОЛЕВАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

Молекулярная неоднородность существует даже на клеточном уровне между клетками клона, которые имеют аналогичные генетические изменения [33, 34]. Одноклеточное транскрипционное профилирование 430 клеток из 5 различных первичных МГБ выявило внутриопухолевую гетерогенность на клеточном уровне. Отдельные клетки отображали различные варианты транскрипции генов, которые регулируют клеточный цикл, гипоксию, иммунный ответ и возможность образования клона [34]. Возможность развития отдельных клеток в клональные популяции



дополнительно продемонстрировала их уникальную функциональность, включая способность к пролиферации, дифференцировке, а также различную чувствительность к темозоломиду [33]. Сложность внутриклеточной гетерогенности также обусловлена вариациями эпигенетических или транскрипционных программ, которые определяют иерархию клеток с различными способностями к размножению и дифференцировке. Молекулярный фенотип каждой клетки дополнительно изменяется в зависимости от положения этой клетки относительно других клеток и от окружающей среды. Гипоксия [35], сосудистая сеть [36,37] и факторы, секретируемые другими опухолевыми и стромальными клетками, влияют на молекулярный фенотип опухолевой клетки [38]. Молекулярная неоднородность на клеточном уровне еще более усложняет опухолевую неоднородность (рис. 1, С). Удивительно, но несмотря на то, что каждая опухолевая клетка уникальна, опухолевые клетки могут быть объединены в сеть, которая координированно и эффективно реагирует на терапевтическое воздействие [39]. Региональная гетерогенность молекулярных особенностей опухолевых клеток регулируется силами отбора локальных изменений в окружающей среде.

■ ГЛИАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Глиальные стволовые клетки (ГСК) определяются как опухолевые клетки, способные образовывать гетерогенные глиальные опухоли. Они наделены специфическими свойствами, такими как высокая канцерогенная активность, неограниченный потенциал к самообновлению и способность к мультипотентной дифференциации. Признано существование иерархии клеток в глиомах, в том числе и с характеристиками ГСК, хотя ответов на многие вопросы, связанные с их числом, динамикой роста и физиологией, еще не получено, в том числе из-за ограничений в наборах необходимых биомаркеров [40].

Некоторые популяции ГСК демонстрируют более высокую химио- и радиорезистентность, чем нестволовые клетки, что указывает на то, что часть первичной опухолевой популяции может пережить начальную терапию и инициировать рецидив опухоли [41, 40]. ГСК могут преодолевать ущерб, вызванный химио- и лучевой терапией, не только благодаря врожденным свойствам (генетической гетерогенности), но и через адаптивные пути резистентности [38]. Продолжается изучение специфических маркеров на поверхности клеток, представляющих собой популяции ГСК [40]. Например, CD133, обычно используемый маркер ГСК, не может идентифицировать все опухолевые клетки, способные к самообновлению и активации опухоли [42]. Клеточный анализ МГБ также показал, что неожиданно большая субпопуляция клеток (~40%) имела свойства стволовых клеток [34]. Однако неизвестно, какое количество из этих клеток может реализовать способность к самообновлению и инициировать развитие опухоли. Среди них могут встречаться как ГСК, так и их потомство, клетки со свойствами транзитной амплификации. Эта субпопуляция имеет низкую экспрессию генов клеточного цикла, предполагая более медленный рост, чем остальная часть клеток опухоли. Появляются новые свидетельства того, что количество ГСК варьирует в разных подтипах МГБ [43], в первичных и рецидивных опухолях [33, 38] и даже в альтернативных локусах одной и той же опухоли (периваскулярных и гипоксических) [37, 43]. Вопрос, какие субпопуляции ГСК могут инициировать рецидив опухоли, нуждается в дальнейшем уточнении.

Новые методы геномного анализа выявили, как терапевтическое вмешательство изменяет динамику популяций глиомы: было обнаружено увеличение размера популяции ГСК после облучения или химиотерапии. Исследования выявили важные сигнальные пути, которые необходимы для биологической поддержки ГСК [23, 12, 24–27, 31, 40], они представляют собой потенциальные цели для предотвращения рецидива опухоли.

■ ПРОЦЕСС РЕЦИДИВИРОВАНИЯ ГЛИОМЫ

Несмотря на то, что курс лечения каждого пациента с МГБ уникален и зависит от местоположения опухоли, возраста и сопутствующих заболеваний, существуют общепринятые стандарты лечения. Когда это возможно, пациенту с МГБ проводят максимально безопасную хирургическую резекцию, наилучший результат дает тотальное удаление, когда вся опухоль физически удаляется и остается только минимальная остаточная порция, которая невидима при послеоперационном МРТ с контрастным усилением (рис. 2, верхний ряд) [45], затем стандартный протокол лучевой терапии (5 р./нед.; 1–2 г/сут), сфокусированный на зоне опухоли, в сочетании с алкилирующим химиотерапевтическим агентом темозоломидом (75 мг/м²) шестинедельным курсом [13]. После этой фазы лечения у большинства пациентов в случае тотальной резекции наблюдается стабилизация заболевания без нейровизуализационных признаков дальнейшего роста опухоли. Почти все пациенты получают дополнительно курсы темозоломида во время этой ремиссии, хотя остаточные опухолевые клетки, вероятно, подвергаются активной биологической прогрессии [44]. Ремиссия длится от нескольких месяцев до нескольких лет, затем у пациентов появляются признаки локального рецидива вокруг зоны хирургической резекции (рис. 2, верхний ряд), [31]. После того как опухоль начинает снова расти, пациенты могут получить дополнительное лечение, включая повторную резекцию опухоли, бевацизумаб (антитела против VEGF), другую химиотерапию или дополнительную лучевую терапию, ориентированную на зону роста опухоли [5]. Тем не менее такие меры незначительно увеличивают выживаемость. Опухолевые клетки, устойчивые к различным видам лечения, сохраняются в паренхиме головного мозга вокруг ложа удаленной опухоли и лежат в основе рецидивирования, что делает их основной мишенью для преодоления рецидива опухоли.

Анализ геномных изменений в до- и послеоперационных образцах опухоли одного и того же пациента показал, что рецидивирующие опухоли проявляют определенную степень генетической связи с исходной опухолью (клональная эволюция), а также приобретают и новые мутации (субклональная эволюция) [12, 23–27, 31]. Рецидивирование – сложный процесс с разнообразием эволюционных траекторий. Выделяют линейные траектории, при которых рецидивирующие опухоли имеют обширное генетическое сходство с первичной опухолью и разветвленные эволюционные траектории, приводящие к образованию расходящихся клеточных популяций (субклонов) [23, 12, 24–27, 31]. Рецидивирование проявляет высокую степень изменчивости. В процессе канцерогенеза рецидив может возникать как из ранних субпопуляций, так и из более поздних. У большинства пациентов при рецидиве обнаруживаются 50–200 клональных или субклональных мутаций [23, 24, 31], но это число может увеличиться более чем до 1000 в случаях с повреждением антионкогена TP53 (гипермутированные опухоли).



Эти данные также свидетельствуют о том, что эффективность хирургического лечения [45, 46] нужно рассматривать не только с позиции циторедукции и уменьшения физического объема опухоли, но и с позиции изменения динамики и состава популяций опухолевых клеток. Хирургическая резекция снижает внутриопухолевую гетерогенность путем удаления значительного числа субклонов из опухоли. Этот вывод основан на 2 наблюдениях: во-первых, при общей гетерогенности существует локальное однообразие первичных опухолевых клонов, предполагающее ограниченное смешивание опухолевых клеток [23, 12, 24, 26, 27, 31], а во-вторых, сравнение

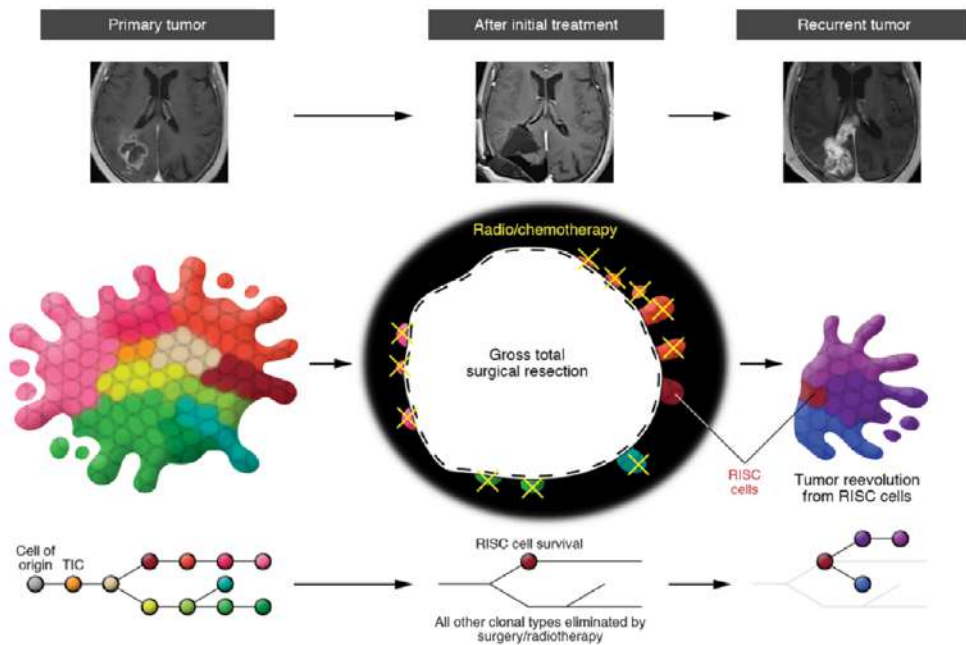


Рис. 2. Лечение и рецидив опухоли при глиобластоме (Satoru Osuka, Erwin G. Van Meir с изменениями): вверху – МРТ пациента с глиобластомой до лечения, после тотальной резекции с последующей химио- и лучевой терапией и после рецидива опухоли; середина – хирургическое вмешательство успешно устраняет множество субклонов. Послеоперационная химио- и радиотерапия может еще больше сократить опухолевую массу вокруг хирургической полости. Однако небольшая часть опухолевых клеток РИСК выживает и инициирует образование рецидивирующей опухоли; внизу – филогенетическое дерево, показывающее процесс клональной эволюции в первичную опухоль, выживаемость РИСК, которые приобрели адаптивную резистентность к терапии после первоначального лечения, и их развитие в рецидивирующую опухоль

Fig. 2. Tumor management and recurrence in glioblastoma (Satoru Osuka, Erwin G. Van Meir with modifications): at the top – MRI of a patient with glioblastoma before treatment, after total resection followed by chemotherapy and radiotherapy, and after tumor recurrence; at the middle – surgery successfully eliminates multiple subclones. Postoperative chemotherapy and radiotherapy may further reduce tumor mass around surgical cavity. However, a small fraction of RISC tumor cells survives and initiates the formation of recurrent tumor; at the bottom – a phylogenetic tree demonstrating the process of clonal evolution into the primary tumor, the survival of RISC cells that acquired adaptive resistance to therapy after initial treatment, and their evolution into recurrent tumor

первичных и рецидивирующих опухолей пациентов, получивших только хирургическое лечение, показывает, что рецидивные опухоли достаточно рано начинают отличаться от первичной опухоли по спектру генетических изменений [23, 26]. Послеоперационная химио- и лучевая терапия может также уменьшить клональное разнообразие, но клиническое применение этих методов эффективно лишь для уничтожения инфильтративно расположенных опухолевых клеток, оставшихся после операции. Несмотря на проведенное комплексное лечение, небольшие фракции клонов, находящиеся вокруг зоны хирургического вмешательства, выживают и приводят к рецидиву (рис. 2, средний ряд). Из большого количества первичных опухолевых клонов важно выделить те, которые способны дать начало рецидивизирующим клеткам. Глубокое секвенирование множества пар образцов первичных и рецидивных МГБ показало, что рецидивные клоны могут происходить от клона, расположенного в начале, середине или конце процесса клональной эволюции первичной опухоли (рис. 2, нижний ряд) [23, 31]. Этот феномен характерен для глиом в отличие от других видов опухолей, при которых рецидивирующие клоны происходят из клонов конечной точки клональной селекции. Доминирующий клон при рецидиве обычно не является линейным потомком основного клона первичной опухоли.

■ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

Эти сигнальные пути активируются посредством аутокринной или паракринной секреции факторов роста и цитокинов, а также гомотипических контактов с опухолевыми клетками и гетеротипических взаимодействий опухолевых, стромальных, эндотелиальных и иммунных клеток (рис. 1, С). Наиболее изученными являются Wnt/ β -catenin, Notch [69], рецепторы тирозинкиназы (RTK)/PI3K, NF- κ B [49], SHH/GLI, JAK/STAT сигнальные пути и другие, недавно исследованные [40]. Эти пути определяют уникальные свойства в различных типах нормальных и опухолевых стволовых клеток [40].

■ ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ, СВЯЗАННЫЕ СО СВОЙСТВАМИ ГСК

Вышеуказанные сигналы интегрируются посредством активации ограниченного числа транскрипционных факторов, которые контролируют различные функции, лежащие в основе функционирования ГСК, включая выживаемость, самообновление, пролиферацию, метаболизм и др. Они включают: OLIG2, с-Мус, BMI1, SOX2, NANOG [63], OCT4 и ID1. Известно, что некоторые факторы транскрипции поддерживают несколько типов нормальных стволовых клеток, а с-Мус и OCT4 могут индуцировать образование ГСК из астроцитов. Экспрессия всех этих факторов транскрипции может повышаться в ГСК и контролируется внеклеточными сигнальными путями, суперэнхансерами [67, 66], эпигенетической регуляцией и микроРНК [52]. Они также активируют пути восстановления повреждений ДНК, которые способствуют терапевтической устойчивости ГСК [40].

■ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК И ДРУГИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Активация внутренних или адаптивных путей репарации повреждений ДНК является важным фактором в хемо- и радиорезистентности опухолевых клеток.



Белки контрольной точки клеточного цикла ДНК могут делать человеческие ГСК более устойчивыми к радиационно-индуцированному апоптозу за счет повышения эффективности восстановления поврежденной ДНК. ГСК демонстрируют повышенную экспрессию генов атаксии телеангиэктазии (ATM), белка контрольной точки клеточного цикла RAD17 и контрольных киназ CHK1 и CHK2. О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT) представляет собой восстановительный фермент ДНК, уровень экспрессии которого регулируется эпигенетически в промоторе гена и коррелирует с резистентностью к химиотерапии, делает устойчивой ГСК к воздействию темозоломида [41]. Секреция экзосом, активация аутофагии, повышенный клеточный метаболизм [43], ROS-продуцирование [50, 51], отток лекарственного средства drug efflux и экспрессия микроРНК [52] также изменяются в ГСК, что может дополнительно усиливать терапевтическую резистентность.

■ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ МИШЕНЕЙ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ ДЛЯ СДЕРЖИВАНИЯ ГСК

Большинство клинических испытаний нацелены на рецепторы или их лиганды, которые иницируют внеклеточную сигнализацию. Однако множественные внеклеточные сигнальные пути, регулирующие факторы транскрипции ГСК, многократно избыточны, и если один основной путь ингибируется препаратом, включаются альтернативные пути активации транскрипции и формируется лекарственная резистентность [53]. В то же время важные факторы транскрипции, необходимые для функционирования ГСК, в качестве мишени практически не используются в основном из-за трудностей при проектировании малых молекул для их применения в таргетной терапии. Создание принципиально новых лекарств и подходов (например, иРНК, сшитые пептиды или искусственные факторы транскрипции) позволит использовать факторы транскрипции, которые управляют сигнальными путями развития, влияющими на развитие ГСК.

■ СОСТОЯНИЕ ПОКОЯ

Эффективность лучевой и химиотерапии во многом зависит от скорости пролиферации клеток, которая лежит в основе повышенной чувствительности опухолевых клеток в отличие от нормальных [69, 54]. Следовательно, клетки МГБ в состоянии покоя могут сыграть важную роль в рецидивировании, как показали исследования на мышах и людях [38]. Около 40% опухолевых клеток в человеческой МГБ имеют генетический профиль, характерный для стволовых клеток с низкой пролиферативной способностью [34], но молекулярные механизмы, которые определяют функции стволовой клетки в сочетании с состоянием низкой пролиферативной активности, у ГСК до сих пор неизвестны. В нормальных стволовых клетках это регулируется локальными факторами, которые обеспечивают баланс самообновления и дифференцировки через асимметричное деление клеток, однако этот процесс в глиомах нарушен [55]. Изучение и поиск эффективной терапии для медленно растущих клонов являются сложной задачей, поскольку они рассредоточены и за пределами объема опухоли. Тем не менее намечается продвижение в понимании механизмов функционирования медленно растущих ГСК [38]. Углубление знаний о способах сигнализации, поддерживающих статус низкой пролиферативной способности, откроет новые мишени для уничтожения РИСК.

■ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОПУХОЛИ И СТРОМЫ, МИКРОСОЦИАЛЬНАЯ СРЕДА

Нарушения взаимодействия опухоли и стромы, которые поддерживают выживаемость ГСК, являются еще одним потенциальным подходом к изучению ГСК. Для роста и развития ГСК, как известно, необходимо взаимодействие с эндотелиальными клетками [36] и перицитами [56] в периваскулярных областях. Изменения микросреды, такие как гипоксия, также могут сделать опухоль более устойчивой к традиционной терапии. В состоянии гипоксии клетки проявляют повышенную радиорезистентность, поскольку кислородные радикалы играют важную роль в повреждении, вызванном облучением, а также потому что индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор (HIF) изменяет ответ на повреждение ДНК [57]. Цитотоксические агенты, доставляемые через кровь, диффундируют в опухоль из функционирующих кровеносных сосудов, а гипоксические регионы наиболее удалены от этих сосудов. В другой ситуации гипоксия способствует развитию ГСК через HIF-опосредованную активацию индуцирующей оксид азота синтазы (iNOS). И HIF-1, и HIF-2 важны для поддержания ГСК и ангиогенеза в опухоли [35]. ГСК демонстрируют пластичность метаболических путей, которые они используют, чтобы адаптироваться к ограничениям питательных веществ в окружающей их среде [43, 58]. Хотя вся сложность метаболических изменений в ГСК до конца не изучена, метаболические ингибиторы в будущем могут применяться для таргетной терапии. Некоторые исследования показывают, что ГСК предпочитают использовать окислительное фосфорилирование, в то время как остальная часть опухоли – гликолиз, что указывает на возможность применения в лечении митохондриальных ингибиторов [58].

■ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ГЛИОМЕ

Опухолевые клетки могут уклоняться от иммунного ответа путем активации рецепторов (PD-1 и CTLA-4) на эффекторных Т-клетках, таким образом блокируя противоопухолевый иммунный ответ. Фактор «запрограммированная смерть – 1» (Programmed death-1) (PD-1) представляет собой рецептор Т-клеток, который после активации его лигандом (PD-L1) может отрицательно регулировать опосредованный Т-клетками иммунный ответ. Опухолевые клетки, включая МГБ, сверхэкспрессируют PD-L1. Блокада пути PD-1 у мышей способствует уничтожению ГСК клетками NK.

Антитела против PD-1 и CTLA-4 продемонстрировали впечатляющую эффективность с высокой частотой ответа и ремиссии опухолей нескольких типов в клинических испытаниях [59], в настоящее время ведутся исследования на МГБ (NCT02667587, NCT02017717, NCT02311920; ClinicalTrials.gov). Пациентам с гипермутированными опухолями могут помочь вышеупомянутые ингибиторы, потому что увеличенная неоантигенная нагрузка способствует более сильному иммунному ответу [23, 24, 60]. ГСК также модулируют иммунную систему, рекрутируя микроглию и макрофаги путем формирования иммуносупрессивного фенотипа через секрецию IL-10 и TGF- β [39]. Эти новые открытия предлагают использование таргетной терапии для активации иммунного ответа против РИСК.



■ БУДУЩАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ СТРАТЕГИЯ: КОНЦЕПЦИИ И СРОКИ

Благодаря лучшему пониманию механизмов формирования резистентности в рецидивирующей опухоли (рис. 2), можно предположить новые терапевтические стратегии. Текущая клиническая стратегия имеет недостатки (рис. 3, А). Будущая молекулярно-таргетная терапия должна быть разработана по крайней мере для 4 типов опухолевых клеток, различных по свойствам и реакции на лечение:

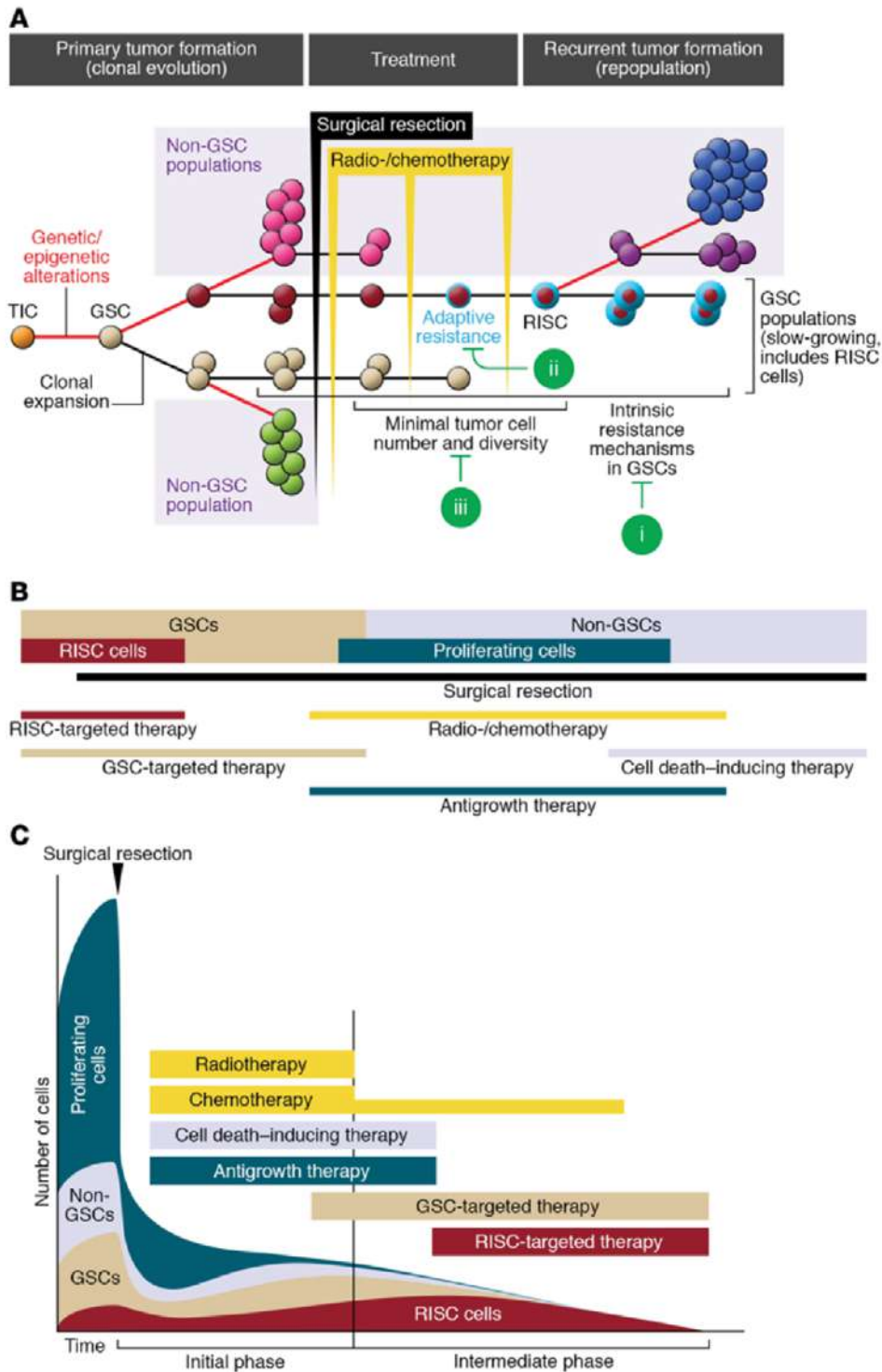
- 1) первичных ГСК;
- 2) РИСК;
- 3) пролиферирующих (нестволовых);
- 4) постмитотических (нестволовых).

Необходимо улучшение таргетной терапии опухоли во время промежуточной фазы, которая следует за периодом первичной терапии и заканчивается с развитием рецидива опухоли. На этом этапе в течение нескольких месяцев нейровизуализация часто показывает ремиссию/стабилизацию, но резистентные опухолевые клетки остаются без лечения и получают время, чтобы оправиться от первоначальной терапии, и возможность прогрессировать. В настоящее время агрессивная терапия на этом этапе не проводится, за исключением поддерживающей терапии темозоломидом [44]. В этом терапевтическом окне опухоль наиболее уязвима, так как гетерогенность и количество опухолевых клеток наименьшие и они, возможно, еще не приобрели полной резистентности.

Вторая возможность заключается в воздействии на первично резистентную субпопуляцию опухоли. Основным эффектом радиационной и алкилирующей химиотерапии является повреждение ДНК, и этот эффект в основном (но не исключительно) зависит от скорости деления клеток [69, 54]. Медленно растущие опухолевые клетки являются важными мишенями для предотвращения химио- и радиорезистентности. Однако в большинстве методов молекулярно-таргетной терапии основными целями являются высоко экспрессированные молекулы, обнаруженные на большинстве опухолевых клеток, например рецепторы тирозинкиназы и их нисходящие сигнальные эффекторы. Несмотря на то что эти методы лечения эффективны для контроля исходной опухоли, они бесполезны для предотвращения рецидива, так как повреждают только пролиферирующие клетки.

Третий момент, заслуживающий значительного внимания, относится к приобретенным механизмам резистентности. Предварительные попытки разработать новые молекулярные методы лечения, ориентированы на врожденную резистентность. Однако предшественники РИСК могут также стать радиорезистентными путем нескольких приобретенных механизмов во время промежуточной фазы заболевания [38]. Идентификация новой мишени приобретенной резистентности является в настоящее время актуальной проблемой, так как отсутствуют необходимые экспериментальные модели, специально предназначенные для этих целей в случае с глиомой [38]. Необходимо разработать новые модели для поиска мишеней и проверки соответствующих таргетных агентов. Мозг остается недоступным для большинства химиопрепаратов, однако появляются все новые и новые подходы, открывающие гематоэнцефалический барьер, что делает доступным проникновение в ЦНС множества препаратов, которые уже используются для лечения других видов опухолей [68].

Будущие методы молекулярной терапии должны быть разработаны для всех опухолевых субпопуляций, причем подавление клеток РИСК является наиболее важным





◀ Рис. 3. Возможности будущей молекулярно-таргетной терапии глиобластомы (Satoru Osuka, Erwin G. Van Meir с изменениями): А – первичная опухоль неоднородна и состоит из нескольких клеточных субпопуляций: клетки с различными свойствами к пролиферации (розовый и зеленый), ГСК (коричневые) и РИСК (красные). Комплексная терапия успешно уменьшает объем опухоли и ее неоднородность. Тем не менее субпопуляции РИСК переживают терапевтическое вмешательство (обозначены синим кольцом). РИСК инициируют рецидив опухоли через второй этап клональной эволюции. Текущие клинические стратегии для МГБ могут быть усилены путем добавления молекулярных методов, направленных: на (i) изначально устойчивые клоны, (ii) механизмы адаптивной устойчивости и (iii) опухоль, когда ее популяционное разнообразие на самом низком уровне; В – схематическое изображение 4 популяций клеток в опухоли (ГСК (коричневый), РИСК (красный), не-ГСК (светло-голубой) и пролиферирующие не-ГСК (темно-синий)) и предполагаемые способы их подавления. РИСК, вероятно, представляют собой подмножество популяций ГСК с врожденной и приобретенной устойчивостью; С – предлагаемые оптимальные сроки для каждой терапевтической опции при первичном лечении и в период стабилизации/ремиссии

Fig. 3. Opportunities of future molecular targeted therapy in glioblastoma (Satoru Osuka, Erwin G. Van Meir, amended): A – the primary tumor is heterogeneous and consists of several cell subpopulations: cells with different proliferating properties (pink and green), glioma stem cells (GSCs) (brown) and relapse-inducing cells (RISC) (red). Complex therapy successfully reduces tumor size and heterogeneity. However, subpopulations of RSCs survive therapeutic intervention (indicated by the blue circle). RISCs initiate tumor recurrence through the second stage of clonal evolution. Current clinical strategies for GBM could be enhanced by adding molecular techniques targeting (i) intrinsically resistant clones, (ii) mechanisms of adaptive resistance, and (iii) tumor when its population diversity is at its lowest; B – schematic representation of four cell populations in the tumor (GSCs (brown), RISCs (red), non-GSCs (light blue) and proliferating non-GSCs (dark blue)) and expected ways for their suppression. RISC cells probably represent a subset of innate and acquired resistance GSCs populations; C – suggested optimal timing for each therapeutic option in initial treatment and in stabilization/remission period

для предотвращения рецидива опухоли. Соответствующая терапия необходима для каждого типа клеток (рис. 3, В), и ее необходимо проводить в нужное время (рис. 3, С). Ряд ингибиторов для этих клеточных мишеней уже используются в клинических испытаниях для некоторых видов опухолей и в скором времени будут протестированы при МГБ.

Радио- и химиотерапия являются подходящим лечением для пролиферирующих нестволовых клеток глиомы, которые чувствительны к ДНК-разрушающим агентам. Проапоптотические агенты можно использовать для медленно растущих дифференцированных нестволовых клеток [68]. Чтобы еще больше уменьшить разделение популяций, не относящихся к ГСК, радио- и химиотерапия должна по-прежнему предлагаться в качестве первоначального лечения после хирургического удаления. Адьювантная химиотерапия является одним из вариантов поддержания подавления деления не-ГСК в промежуточной фазе (ремиссии), как и молекулярная терапия, нацеленная на многочисленные сигнальные пути роста.

Существующие ингибиторы путей Wnt, SHN и Notch являются перспективными агентами терапии для всех ГСК. В будущем также могут быть таргетированы факторы транскрипции, определяющие стволовую способность клеток глиом. Молекулярная терапия, нацеленная на эпигенетическое перепрограммирование (метилирование ДНК и модификация гистонов) [19, 64], активированные гипоксией пути, ангиогенез и метаболическое перепрограммирование перспективны для лечения ГСК [43, 58]. Они должны применяться начиная с конца начальной терапевтической фазы и непрерывно следовать во время фазы ремиссии, когда появляется популяция РИСК.

Для устранения РИСК необходим новый подход к таргетной терапии. Ее необходимо начать по возможности раньше, чтобы полностью исключить появление

устойчивых клеток – предшественников РИСК. Методы, ориентированные на срыв механизмов адаптивного сопротивления и блокирование иммунного подавления, должны проводиться в фазе ремиссии [23, 12, 60]. Новейшие наработки из области виротерапии также можно рассматривать для устранения всех ГСК, включая РИСК [65, 69].

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Korotkevich E.A. *Glial tumors of the brain*. Minsk: Medicine. 2017; 120 p. (in Russian)
2. Barthel L, Hadamitzky M, Dammann Ph, Schedlowski M, Sure U, Thakur BK, Hetze S. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2022 Mar;41(1):53–75. doi: 10.1007/s10555-021-09997-9
3. Oleshkevich F.V. Modern treatment of neuroectodermal brain tumors. *Medical news.* 2004;5:44–45. (in Russian)
4. Smeyanovich A.F., Sagun A.E. Assessment of the quality of life of patients in neurooncological practice / A.F. Smeyanovich, // *Neurology and neurosurgery in Belarus.* 2009;2:58–65. (in Russian)
5. Mufazalov F.F. Modern tactics of treatment of malignant gliomas of the brain and the case of a complete response of the tumor against the background of long-term use of bevacizumab. *Malignancy. tumors.* 2017;7(2):33–39. (in Russian)
6. Uddin S, Mamun AA, Alghamdi BS, Tewari D, Jeandet P, Sarwar S, Ashraf G. Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches. *Semin Cancer Biol.* 2022 Aug;83:100–120. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.12.015
7. Konovalov A.N. *Modern technologies in neurosurgery. Modern technologies and clinical research in neurosurgery*: in 3 volumes / ed. A.N. Konovalova. T. 1, ch. 2. M. 2012; p. 55–113. (in Russian)
8. Osuka S., van Meir E.G. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *The J. of Clin. Invest.* 2017;127(2):415–426.
9. Takashi Komori Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Lab Invest.* 2022 Feb;102(2):126–133. doi: 10.1038/s41374-021-00667-6. Epub 2021 Sep 9
10. Delgado-López P.D., Corrales-García E.M. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin. & Transl. Oncol.* 2016;18(11):1062–1071.
11. Colditz M.J., Jeffrey R.L. Aminolevulinic acid (ALA) – protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies. *J. of Clin. Neurosci.* 2012;19(11):1471–1474.
12. Johnson BE. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science.* 2014;343(6167):189–193.
13. Ryken TC, Kalkanis SN, Buatti JM, Olson JJ, AANS/CNS Joint Guidelines Committee. The role of cytoreductive surgery in the management of progressive glioblastoma: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* 2014;118(3):479–488.
14. Weller M. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* 2014;15(9):e395–e403.
15. Lau D, Magill ST, Aghi MK. Molecularly targeted therapies for recurrent glioblastoma: current and future targets. *Neurosurg Focus.* 2014;37(6):E15.
16. Bastien JI, McNeill KA, Fine HA. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer.* 2015;121(4):502–516.
17. Sullivan JP. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov.* 2014;4(11):1299–1309.
18. Murtaza M. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun.* 2015;6:8760.
19. Ceccarelli M. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell.* 2016;164(3):550–563.
20. Alcantara Llaguno SR. Adult lineage-restricted CNS progenitors specify distinct glioblastoma subtypes. *Cancer Cell.* 2015;28(4):429–440.
21. Li F. NAD(P)⁺-IDH mutations promote hypersuccinylation that impairs mitochondria respiration and induces apoptosis resistance. *Mol Cell.* 2015;60(4):661–675.
22. Flavahan WA. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature.* 2016;529(7584):110–114.
23. Kim H. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res.* 2015;25(3):316–327.
24. Wang J. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet.* 2016;48(7):768–776.
25. Sottoriva A. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(10):4009–4014.
26. Mazar T. DNA methylation and somatic mutations converge on the cell cycle and define similar evolutionary histories in brain tumors. *Cancer Cell.* 2015;28(3):307–317.
27. Suzuki H. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet.* 2015;47(5):458–468.
28. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194(4260):23–28.
29. Paraf F, Jothy S, Van Meir EG. Brain tumor polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol.* 1997;15(7):2744–2758.
30. Rajaraman P. Genome-wide association study of glioma and meta-analysis. *Hum Genet.* 2012;131(12):1877–1888.
31. Kim J. Spatiotemporal evolution of the primary glioblastoma genome. *Cancer Cell.* 2015;28(3):318–328.
32. Osswald M. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature.* 2015;528(7580):93–98.
33. Meyer M. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(3):851–856.
34. Patel AP. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science.* 2014;344(6190):1396–1401.
35. Li Z. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell.* 2009;15(6):501–513.
36. Calabrese C. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007;11(1):69–82.
37. Pietras A. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell.* 2014;14(3):357–369.
38. Osuka S. IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells.* 2013;31(4):627–640.



39. Zhou W. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol.* 2015;17(2):170–182.
40. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 2015;29(12):1203–1217.
41. Liu G. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006;5:67.
42. Chen R. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2010;17(4):362–375.
43. Mao P. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(21):8644–8649.
44. Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;4:CD007415.
45. Marko NF, Weil RJ, Schroeder JL, Lang FF, Suki D, Sawaya RE. Extent of resection of glioblastoma revisited: personalized survival modeling facilitates more accurate survival prediction and supports a maximum-safe-resection approach to surgery. *J Clin Oncol.* 2014;32(8):774–782.
46. Grabowski MM. Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J Neurosurg.* 2014;121(5):1115–1123.
47. Gundem G. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature.* 2015;520(7547):353–357.
48. Murugaesu N. Tracking the genomic evolution of esophageal adenocarcinoma through neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Discov.* 2015;5(8):821–831.
49. Kim SH. Serine/threonine kinase MLK4 determines mesenchymal identity in glioma stem cells in an NF- κ B-dependent manner. *Cancer Cell.* 2016;29(2):201–213.
50. Kim SH, Kwon CH, Nakano I. Detoxification of oxidative stress in glioma stem cells: mechanism, clinical relevance, and therapeutic development. *J Neurosci Res.* 2014;92(11):1419–1424.
51. Yang W, Shen Y, Wei J, Liu F. MicroRNA-153/Nrf-2/GPx1 pathway regulates radiosensitivity and stemness of glioma stem cells via reactive oxygen species. *Oncotarget.* 2015;6(26):22006–22027.
52. Xia H. Loss of brain-enriched miR-124 microRNA enhances stem-like traits and invasiveness of glioma cells. *J Biol Chem.* 2012;287(13):9962–9971.
53. Jun HJ, Bronson RT, Charest A. Inhibition of EGFR induces a c-MET-driven stem cell popul53Touil Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clin Cancer Res.* 2014;20(4):837–846.
54. Vogin G, Foray N. The law of Bergonié and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. *Int J Radiat Biol.* 2013;89(1):2–8.
55. Chen G. Human Brat ortholog TRIM3 is a tumor suppressor that regulates asymmetric cell division in glioblastoma. *Cancer Res.* 2014;74(16):4536–4548.
56. Cheng L. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell.* 2013;153(1):139–152.
57. Burroughs SK, Kaluz S, Wang D, Wang K, Van Meir EG, Wang B. Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. *Future Med Chem.* 2013;5(5):553–572.
58. Kathagen A. Hypoxia and oxygenation induce a metabolic switch between pentose phosphate pathway and glycolysis in glioma stem-like cells. *Acta Neuropathol.* 2013;126(5):763–780.
59. Wolchok JD. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369(2):122–133.
60. Bouffet E. Immune checkpoint inhibition for hypermutant glioblastoma multiforme resulting from germline biallelic mismatch repair deficiency. *J Clin Oncol.* 2016;34(19):2206–2211.
61. Lechman ER. miR-126 regulates distinct self-renewal outcomes in normal and malignant hematopoietic stem cells. *Cancer Cell.* 2016;29(2):214–228.
62. Fidoamore A. Glioblastoma stem cells microenvironment: the paracrine roles of the niche in drug and radioresistance. *Stem Cells Int.* 2016;2016:6809105.
63. Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt SN, Borges I, Ruiz i Altaba A. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J.* 2010;29(15):2659–2674.
64. Suva ML. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell.* 2014;157(3):580–594.
65. Chiocca EA, Blair D, Mufson RA. Oncolytic viruses targeting tumor stem cells. *Cancer Res.* 2014;74(13):3396–3398.
66. Chipumuro E. CDK7 inhibition suppresses super-enhancer-linked oncogenic transcription in MYCN-driven cancer. *Cell.* 2014;159(5):1126–1139.
67. Lin CY. Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature.* 2016;530(7588):57–62.
68. Nordentoft I. Mutational context and diverse clonal development in early and late bladder cancer. *Cell Rep.* 2014;7(5):1649–1663.
69. Wang J. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells.* 2010;28(1):17–28.