

Н.И. Лисяный
А.Н. Лисяный

ГУ «Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова»
НАМН Украины, Киев,
Украина

СТВОЛОВЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА

Ключевые слова: стволовые нейральные клетки, стволовые опухолевые клетки, глиомы, глиобластомы, CD133⁺-клетки.

Резюме. Проанализированы последние данные об опухолевых стволовых клетках (ОСК), которые определяются в злокачественных глиомах мозга. ОСК подобны нормальным нейральным стволовым клеткам. Они являются причиной рецидивирования и повторного роста злокачественных глиом. ОСК экспрессируют CD133⁺-молекулу, которая является их маркером, они способны к миграции и инфильтрации из опухоли в паренхиму мозга. Кроме того, ОСК являются химио- и радиорезистентными и в эксперименте вызывают опухолевый рост у иммунодефицитных животных. ОСК — объект для исследований и разработки новых методов лечения пациентов со злокачественными глиомами мозга.

За последние 10 лет достигнут значительный прогресс в изучении природы опухолей, уточнении механизмов контроля пролиферации клеток, апоптоза, инвазии, ангиогенеза, метастазирования. Эти новые данные были получены при изучении клеточного состава и структуры опухолей, различных путей передачи внутриклеточных сигналов, молекулярных процессов онкогенеза. Фундаментальные достижения в онкологии стали основой для разработки новых и усовершенствования существующих методов лечения, например целенаправленной терапии молекулярного действия, хотя результаты такой терапии сегодня достаточно скромные.

Известно, что солидные опухоли, включая и опухоли мозга, гетерогенны по своей гистологической структуре и включают различные опухолевые клетки, строму, сосудистую сеть, воспалительные инфильтраты и т.д. Среди популяций различных типов клеток, присутствующих как при гемобластозах, так и в солидных опухолях, была выявлена небольшая субпопуляция клеток со свойствами стволовых, получившая название раковых, или опухолевых стволовых клеток (ОСК), что послужило основанием для создания новой опухоли-стволовой теории онкогенеза [1–9].

Первоначально ОСК были выявлены и выделены при острой лейкемии, были изучены их колониеобразующие свойства и установлена фенотипическая характеристика как CD34⁺-, так и CD38⁻-стволовых клеток, которые присутствуют в небольшом количестве также и в нормальном костном мозге [1]. Трансплантация этих клеток иммунодефицитным мышам приводила к развитию лейкемии, тогда как CD34⁻-клетки не вызывали опухоли даже при введении в 100–500 раз большего их количества [1, 7]. В последние годы ОСК выявлены при многих видах злокачественных процессов, включая лейкемию, рак простаты, кишечника, легкого, печени и т.д. [1, 9–14]. Способность к индукции опухоли при ксенотрансплантации (клетки человека вводили мышам) явилась одним

из основных свойств ОСК и послужила важным аргументом для опухоли-стволово-клеточной теории онкогенеза [14, 15]. Эта популяция клеток была способна индуцировать рост опухоли у иммунодефицитных животных. Кроме того, она ответственна за такие свойства опухоли, как способность к метастазированию, инфильтративному росту и рецидивированию, а также за устойчивость к химио- и лучевому лечению [3, 6, 14, 16].

Среди большого количества исследований по этой проблеме, проводимых при разных видах и локализации злокачественных новообразований, особое место занимает изучение ОСК, выделенных из злокачественных глиальных опухолей нервной системы, ввиду, во-первых, биологических особенностей этих опухолей и, во-вторых, большой схожести ОСК, выделенных из глиом, с нейральными стволовыми клетками (НСК) эмбрионального или взрослого мозга [3, 6, 9, 14, 16, 17].

Известно, что глиобластомы и анапластические астроцитомы являются одними из наиболее злокачественных опухолей головного мозга, при которых средняя продолжительность жизни больных колеблется от 1 до 3 лет в зависимости от степени анаплазии опухоли [18–22]. Клетки глиобластомы имеют высокую способность проникать в окружающую ткань, мигрировать далеко от места роста, например в контрлатеральное полушарие мозга, вызывать рецидивы заболевания, несмотря на агрессивную комбинированную терапию [19–23]. Более того, инфильтративный характер роста опухоли часто ограничивает возможность полного ее удаления [20, 24]. Еще в 30-е годы XX в. W. Dahely [25] описывал повторные контрлатеральные глиальные опухоли даже после удаления целой гемисферы мозга. Радиотерапия и химиотерапия при глиобластомах дают ограниченный эффект в силу своей токсичности и снижения качества жизни, а также устойчивости опухолевых клеток к этим методам лечения [22, 21, 26, 27]. И наконец, глиомы воздействуют на иммунную систему, вызывают угнетение иммунных функций, индукци-

руют появление регуляторных супрессорных клеток в ткани опухоли в организме [28, 29].

Нормальные НСК, на которые похожи ОСК глиобластом, изучаются давно и уже достаточно хорошо изучены. НСК — это популяция клеток, которая экспрессирует нестин и CD133⁺-маркер [30] и не окрашивается красителем Hoechst due 33342, а также обладает способностью к образованию при культивировании так называемых побочных популяций (side population) [30–32]. Нормальные НСК при культивировании в условиях присутствия факторов роста и отсутствия сыворотки образуют в течение 10–12 дней так называемые нейросферы — скопление незрелых стволовых клеток, способных к самовоспроизведению и пролиферации. При добавлении питательной сыворотки и дифференцировочных факторов эти клетки превращались в прогениторные дифференцированные нервные клетки [30, 32]. Аналогичные клетки с подобными свойствами были выделены из мультиформных глиобластом, эпиндимом, медуллобластом [3, 6, 14, 16, 33]. Первые работы по этой проблематике показали, что недифференцированные ОСК присутствуют в глиобlastомах, экспрессируют CD133⁺-антиген на своей поверхности, подобно нормальным НСК. Кроме того, выделенная из глиобластом очищенная CD133⁺-популяция ОСК способна индуцировать опухоль у иммунодефицитных мышей, тогда как популяция CD133⁻-клеток не вызывала опухолевого роста у иммунодефицитных животных [3, 14].

Многими авторами установлено, что стволовые клетки, как мезинхимальные, так и нервные, имеют тропизм к опухолям, они способны мигрировать из контрлатеральной гемисферы в опухоль. Этот тропизм связан с определенными цитокиновыми рецепторными комбинациями [32, 35–37]. Молекулярные основы тропизма стволовых клеток к опухоли еще плохо изучены, но уже указано на важность хемоаттрактантов семейства SCF/K-kit, HGF/C-Met, MCP-1/CCR2, экспрессируемых на НСК и определяющих направленную миграцию стволовых клеток в опухоль [38–41]. Миграция НСК зависит от C-Met и фосфоинозитинкиназного сигнального пути стволовых клеток [42].

В свою очередь, злокачественные глиомы активно выделяют антигенные цитокины, ИЛ-8, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), нейротрофин-3, которые активно привлекают мезинхимальные стволовые клетки [43–45]. Помимо этого, такие молекулы адгезии, как V-1- и V-2-интегрин и L-селектин, играют роль как в мобилизации, так и в накоплении мезинхимальных стволовых клеток в глиоме [46, 47]. В процессе миграции стволовых клеток в опухоль принимают участие матриксные металлопротеиназы (ММП), такие как ММП-2 и мембранно-связанная ММП-14 (MT1-MMP) [48]. На стволовых клетках экспрессирован хемокиновый рецептор CXCR-4, а его лиганд SDF-1α экспрессируется на активированных астроцитах, эндотелиальных и опухолевых клетках, что приводит к их взаимодействию и способствует миграции и пролиферации стволовых клеток в паренхиме опухоли.

Если же ингибировать этот рецептор, то такой миграции в опухоль не отмечается [49]. Антагонисты CXCR-4 подавляют миграцию стволовых клеток как в глиобластоме, так и медуллобластоме [50]. Этот механизм взаимодействия CXCR-4/SDF-1α характерен не только для клеток опухолей мозга, но и для других опухолей. В частности, блокада CXCR-4-рецептора на клетках рака легкого приводила к торможению метастазирования этого рака в мозг [51].

Следовательно, уже известно достаточно много различных молекулярных механизмов, которые участвуют в процессах миграции в ткань опухоли мозга нормальных стволовых (как нервных, так и мезинхимальных) клеток. Многие из этих механизмов характерны и для ОСК, выделенных из глиомы мозга. Разработана технология выделения ОСК из злокачественных глиальных опухолей. Изучены такие их свойства, как высокая инвазивность, устойчивость к химио- и лучевой терапии, способность к миграции на большое расстояние в мозговую паренхиму [3, 9, 14, 35, 52, 53]. Сегодня еще не до конца изучены и природа ОСК, и их происхождение. Предполагается, что эти клетки возникли либо из нормальных стволовых и прогениторных нервных клеток в силу мутации последних, либо путем дедифференцировки зрелых глиальных клеток под действием мутаций и канцерогенов. В общем обе гипотезы происхождения ОСК имеют место [5, 34, 43, 53].

В последнее время накапливается все больше информации о опухолевых свойствах эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Так, показано, что подкожное введение ЭСК иммунодефицитным сингенным или аллогенным мышам вызывает развитие у них тератом в 95% случаев [54]. Это является доказательством того, что стволовые клетки и без мутаций могут вызывать опухолевый рост. Последнее формирует проблемы и круг спорных вопросов, касающихся потенциального использования клеточной терапии стволовыми клетками в регенеративной медицине.

Трансплантация крысам с болезнью Паркинсона дифференцированных *in vitro* ЭСК в дофаминергические прогениторы не вызывала развития тератом, несмотря на введение циклоспорина [55]. Однако в более поздних работах было продемонстрировано, что и дифференцированные *in vitro* прогениторы при трансплантации мышам на фоне введения циклоспорина индуцировали развитие тератом у небольшой части животных (у 2 из 15) [56]. В экспериментах с ксенотрансплантацией человеческих ЭСК крысам с патологией центральной нервной системы было установлено, что иммуносупрессия необходима для лучшей интеграции, но при этом повышается риск образования опухолей. Эта проблема к настоящему времени изучена еще недостаточно. Тератомы могут возникать при введении ЭСК или их дифференцированных прогениторов и в других тканях, включая печень [57, 58], миокард [59]. В то же время имеются работы, в которых доказано, что предварительная дифференцировка ЭСК *in vitro* может предупреждать или снижать риск развития тератом [60].

Благодаря этому возникла гипотеза, что трансплантация ЭСК в иммуносупрессивный аллогенный организм ведет к развитию опухоли, тогда как дифференцировка ЭСК *in vitro* снижает туморогенность трансплантата [61].

В более поздней работе R. Dressel et al. [54] установлено, что способность дифференцированных прогениторов вызывать тератому связана с тем, что среди этих клеток присутствует до 10% недифференцированных ЭСК, за счет которых происходит индукция опухоли. Эти авторы показали, что и ЭСК, и дифференцированные нейрональные прогениторы в дозе $1 \cdot 10^6$ клеток в 95% случаев вызывают тератомы у сингенных, но не у несингенных животных. Но если ЭСК вводить иммуносупрессивным животным (после введения циклоспорина) или с генетическим или приобретенным дефектом иммунной системы, то наблюдается рост тератом. Наличие минимальных различий в экспрессии HLA-антигенов достаточно для запуска иммунных реакций, которые тормозят развитие тератом. Угнетение иммунной системы или ее дефект блокирует развитие реакций отторжения, что приводит к формированию тератом. Однако полной ясности в этом вопросе пока еще нет. Приведенные выше данные доказывают, что ЭСК, которые обладают тотипотентными и мультипотентными свойствами, способны вызывать развитие опухолей без дополнительного мутагенного на них воздействия. В то же время для тканеспецифических стволовых клеток, например гематогенных или нейрогенных, по-видимому, необходимо определенное онкогенное воздействие, которое приводило бы к превращению их в ОСК.

ОСК, выделенные из глиальных опухолей, в настоящее время интенсивно изучаются. Уже установлено, что это неоднородная гетерогенная популяция клеток, среди которой наиболее важными являются те, которые способны индуцировать рост повторной опухоли в мозге больного или первичную опухоль у иммунодефицитных животных при введении им этой субпопуляции ОСК [62].

Кроме того, эти клетки экспрессируют CD133-молекулу — променин-1, которая относится к разряду молекул адгезии. В ОСК экспрессируется онкоген *c-Myc*, белок *c-Myc* необходим для поддержания пролиферативного потенциала этих клеток. Блокада гена или полное его выключение (нокаут) приводит к снижению пролиферации ОСК, остановке клеток на фазе G0/G1, с последующим апоптозом. В других (нестволовых) опухолевых глиальных клетках блокада гена *c-Myc* не влияет на пролиферативный потенциал. Снижение уровня *c-Myc*-белка приводит к потере клетками CD133⁺ способности образования нейросферы в культуре и неспособности индуцировать рост опухоли человека у мышей при введении ОСТ. Эти данные позволили авторам утверждать, что *c-Myc* является одним из регуляторов пролиферации и выживания ОСК [63].

CD133⁺ ОСК присутствуют и в опухолевых клеточных линиях, например в клеточной линии медуллобластом. Введение клеток этой линии мышам приводило к развитию CD133⁺ медуллобластомы, а факторы роста (эпидермальный (EGF) и эндотелия сосудов (VEGF)) стимулировали увеличение количества CD133⁺-клеток в культуре, а также усиливали экспрессию MMP, в частности, MT-1MMP, что приводило к более быстрому росту опухоли при введении животным этих активированных клеток [64]. Помимо MMP, на активность ОСК влияет экспрессия молекул адгезии L-ICAM, которые выявляются на CD133⁺-клетках. Подавление экспрессии этих молекул приводило к апоптозу и торможению роста опухоли [65, 66]. Авторы считают, что L-ICAM связана с транскрипционными факторами *olig2* и *p21*, которые регулируют пролиферацию клеток, и рекомендуют использовать L-ICAM как мишень для терапии глиом [67].

Содержание в опухоли ОСК может зависеть от многих условий, в том числе от гипоксии; усиление гипоксии или нарушение функции митохондрий химическим путем способствовало увеличению количества CD133⁺-клеток [58]. Авторы считают, что, регулируя гипоксию ткани опухоли или корректируя митохондриальную дисфункцию, можно достигнуть снижения уровня CD133⁺-клеток в опухоли, а следовательно — снижения их агрессивности и возможности возникновения рецидивов.

Согласно стволово-клеточной теории онкогенеза [2, 3] предполагается, что именно в нормальных стволовых клетках происходят наиболее значимые мутации, приводящие к неограниченной пролиферации, нарушению апоптоза, инвазии и миграции, экспансивному, инфильтративному росту и способности индуцировать новые, повторные опухоли [7, 17, 67, 68]. Имеется достаточно много данных о том, что нормальные НСК и их прогениторы могут превращаться в ОСК и вызывать рост опухоли [62, 64] более часто, чем дифференцированные клеточные типы; показано много общего между прогениторными клетками и клетками глиобластом [68]. В обоих типах клеток задействованы одни и те же сигнальные пути [69]. Исследования на мышцах показали, что генетические альтерации, способствующие делеции опухолевых супрессоров, при активации онкогенов могут приводить к злокачественной трансформации как стволовых клеток, так и их прогениторов [67, 68, 70].

Ретровирусная трансфекция *Akt* и *Ras* в мозг приводила к трансформации недифференцированных нестин⁺-прогениторных клеток в опухолевые со свойствами агрессивности и инвазивности, как у глиобластом. Экспрессия *H-Ras* или *Myc* в олигодендроглиальных прогениторных клетках способствовала развитию высокозлокачественной глиомы [71, 72]. В других опытах показано, что введение методом трансфекции гена рецептора EGF в линию НСК приводило к приобретению агрессивной формы злокаче-

ственного роста, как у глиобластомы. В то же время в дифференцированных линиях астроцитарных прогениторов трансфекция этого рецептора не вызывала появления характеристик злокачественной трансформации [45, 69]. Астроцитарным клеткам мозга необходимо для превращения в опухолевые клетки как минимум 3 генетических нарушения: экспрессия теломеразы и постоянная активация Ras- и Akt-путей передачи сигнала [73, 74]. Число генетических мутаций и aberrаций различно в первичных и вторичных глиомах, что указывает на генетические различия между рецидивирующими и нерезидивирующими глиобластомами [68, 75].

ОСК (CD133⁺) малочувствительны к современным химиопрепаратам, в частности к темозоломиду. Только сублетальные дозы препарата индуцировали апоптоз и ингибировали пролиферацию ОСК. Устойчивость к темозоломиду объясняется наличием метилглутамин — ДНК-метилтрансферазы, которая подавляет его действие [76]. Сопоставление содержания этого фермента в ОСК больших с глиобластомами с клинической эффективностью темозоломида показало, что чем выше уровень фермента, тем ниже активность темозоломида в клинике и наоборот [76]. Облучение глиальной опухоли в терапевтическом диапазоне не влияет на ОСК, и более того — имеются данные, что низкодозированное облучение усиливает агрессивность и резистентность опухолевых клеток за счет 10–20-кратного увеличения содержания белка сурвивина, ответственного за устойчивость к химио- и лучевой терапии [77]. Важное значение для ОСК, помимо молекулы CD133⁺, имеет экспрессия и других дифференцировочных антигенов, в частности белка нестина, характерного для стволовых нервных клеток и очень ранних их прогениторов.

Следует упомянуть результаты изучения 2 групп мультиморфных глиобластом, содержащих либо много, либо мало CD133⁺-клеток в опухоли, согласно которым эти варианты опухоли имели идентичную, характерную для этих глиобластом гистологическую картину. Однако клетки глиобластом, в которых CD133⁺-клеток было мало, имели более высокий пролиферативный и ангиогенный потенциал, чем опухоли, в которых этих клеток было много [79]. Авторы исследований пришли к заключению, что вопреки многочисленным исследованиям есть основание полагать, что CD133⁻-клетки глиобластом также способны индуцировать рост опухоли. Причина таких противоречий в результатах пока что не ясна, возможно, присутствуют и другие иницирующие рост опухоли клетки, которые не экспрессируют CD133⁺-маркер.

ОСК, выявляемые в глиобластомах, отличаются от НСК, хотя многие их признаки сходны, а именно: способность к образованию нейросфер, способность к мультипотентной дифференцировке при действии ее факторов [33]. НСК отличается от ОСК как минимум по 3 признакам: первый — ОСК спо-

собны индуцировать опухоль у иммунодефицитных животных; второй — даже после дифференцировки они снова образуют нейросферу. И, наконец, третий — после введения очищенной популяции ОСК иммунодефицитным животным развивается смешанная опухоль, содержащая как нейрональные, так и глиальные клетки [33].

Выделение ОСК из опухоли возможно либо путем разделения CD133⁻ и CD133⁺-клеток на проточном цитофлуориметре, либо с помощью применения методики «побочной популяции» («Side population» (SP)) [50–52]. Эта техника была разработана для выделения стволовых клеток из костного мозга и основана на их неспособности окрашиваться липофильными красителями (Hoechst due 33342), что позволяет выделить неокрашенную фракцию клеток с высоким содержанием гематогенных стволовых клеток. Данный метод применяют и для выделения ОСК из многих типов опухолей, в том числе и из опухолей мозга [51].

Таким образом, сегодня существует как минимум 3 метода идентификации ОСК: образование *in vitro* нейросфер, выявление экспрессии CD133 и определение SP популяции клеток [53].

Практически все авторы указывают на различное содержание CD133⁺ ОСК в одной и той же опухоли. Например, содержание CD133⁺-клеток в пилоцитических астроцитомах колеблется от 3,5 до 37,1%, в медуллобластомах — от 6,1 до 45,4% [3], а в глиобластомах — от 0,1 до 46,8%, причем в 5 из 20 наблюдений CD133⁺-клеток было больше 15%, тогда как во всех остальных — меньше 5%. Содержание CD133⁺ ОСК в опухоли зависит во многом от методики исследования, их количество можно определять во взвеси опухолевых клеток *in vitro* на проточном цитофлуориметре. Результаты будут приблизительно такими, как приведено выше. Если же выполняются иммуногистохимические исследования на гистологических препаратах, то учет содержания CD133⁺-клеток в ткани опухоли ведется несколько иначе. Так, например, в последней работе Zhang M. et al. [78] приведены данные иммуногистохимического исследования 125 глиальных опухолей различной степени анаплазии, причем 69 из них были высокой степени анаплазии, а 56 — низкой. Оценку содержания CD133⁺-клеток проводили по градации от 0 до 3, где 0 — это отсутствие в опухоли CD133⁺-клеток, 1 (или мало) — наличие до 3% клеток, 2 (или среднее) — от 30 до 60% и 3 (или много) — определяется больше 60% CD133⁺-клеток в опухоли. Среди опухолей низкой степени анаплазии (астроцитомы, эпендимомы и олигодендроцитомы) количество новообразований, в которых не было CD133⁺-клеток, колебалось от 0 до 50%. Частота опухолей с высоким (более 60%) содержанием CD133⁺-клеток была следующей. Из 18 астроцитом ни в одном случае не было выявлено, чтобы опухоль содержала больше 60% CD133⁺-клеток; из 15 эпендимом только в 1 образце таких клеток было выявлено больше 60%. В злокаче-

ственных опухолях (48 глиобластом) CD133⁺-клетки отсутствовали в 10,4% случаев, высокое их содержание установлено в 14 случаях (29,2%). Среди анапластических астроцитом (11 наблюдений) в 2 образцах не было установлено CD133⁺-клеток, в 2 — было выявлено более 60%; остальные опухоли имели средние уровни содержания CD133⁺-клеток [78]. Детальное описание содержания CD133⁺-клеток в отдельных образцах глиальных опухолей необходимо для более полного представления о сложной и неоднозначной трактовке результатов подобных исследований. При одном и том же гистологическом варианте опухоли, например глиобластомах, возможно как полное отсутствие CD133⁺-клеток (в 10%), так и их высокая концентрация (до 30%). Однако при доброкачественных астроцитомах эти клетки отсутствовали в 50% образцов, а в остальных 50% содержалось от 10 до 60% клеток, экспрессирующих CD133. Отсюда возникают следующие заключения. Во-первых, различное содержание CD133⁺ ОСК в близких по гистологии злокачественных опухолях, например глиобластомах, наводит на мысль, что развитие глиобластом возможно и без ОСК, или же CD133 (променин) не является единственным маркером ОСК и нужно параллельно исследовать и другие маркеры. Во-вторых, если в доброкачественных опухолях имеется какое-то содержание CD133⁺-клеток (то есть ОСК), а эти опухоли являются более дифференцированными, то можно предположить, что доброкачественные новообразования возникли не из собственно стволовых клеток (НСК), а уже из дифференцированных прогениторов; однако это еще требуется доказать. И, наконец, в-третьих, почему присутствие (почти в половине образцов) в доброкачественных астроцитомах и эпендимомах большого числа CD133⁺-клеток не приводит к их более злокачественному течению (подобно глиобластомам) и почему нет рецидивирования этих опухолей? Перечень вопросов и предположений, вытекающих из факта различного содержания CD133⁺-клеток как в добро-, так и злокачественных опухолях можно продолжить, и это требует дополнительных исследований.

В той же работе M. Zhang et al. [78] параллельно с CD133⁺-клетками исследовали содержание нестин⁺-клеток в опухолевой ткани методом иммуногистохимии. Были получены близкие по величине и распределению результаты содержания CD133⁺ и нестин⁺-клеток в разных по степени анаплазии глиальных опухолях. Послеоперационная продолжительность жизни больных зависела от наличия в их опухолях обоих типов клеток — CD133⁺ или нестин⁺. Так, 100% выживаемость больных до 30 мес после операции была лишь в группе пациентов, опухоли которых не содержали указанных клеток, тогда как в группе с большим содержанием в опухолях клеток обоих типов выжило лишь 40% больных. К 70 мес в первой группе выжило 81–86%, а во второй лишь 20% больных. На основании этих данных, несмотря на разное содержание

CD133⁺- и нестин⁺-клеток в опухолях одного гистологического типа, авторы рекомендуют содержание CD133⁺- и нестин⁺-клеток в опухоли считать важным прогностическим показателем послеоперационной длительности жизни больных [78].

Химиорезистентность клеток глиом считается одной из причин их прогрессивного роста. Последними исследованиями доказано, что ОСК резистентны к современным таргетным препаратам типа темозоломида [76]. Известно много механизмов устойчивости опухолевых клеток к химиопрепаратам.

Одним из механизмов химиорезистентности при глиомах может быть повышенная экспрессия молекул-транспортеров, которые выталкивают из клетки токсические агенты [24]. SP-клетки, первоначально описанные как первичные примитивные CD133⁺ ОСК, имеют свойство выталкивать из клетки липофильный краситель Hoechst due 33342, что также является проявлением химиорезистентности [81–83]. В то же время нормальные НСК чувствительны к химиотерапевтическим агентам [82, 83]. Применение BCNU, цисплатина или цитарабина вызывало у мышей повреждение физиологических мест расположения стволовых клеток, так называемых ниш (субвентрикулярная зона третьего желудочка, зубчатая извилина гиппокампа, мозолистое тело). Уязвимость НСК и их прогениторов к химиотерапевтическим средствам является одним из отличий нормальных стволовых клеток и ОСК [84].

Теория об ОСК имеет не только теоретическое значение для понимания патогенеза глиом мозга, она дает новые подходы, новую стратегию в терапии глиальных опухолей, которая должна строиться на учете различий между нормальными и опухолевыми стволовыми клетками, что в конечном итоге должно приводить к гибели ОСК и сохранению НСК организма, необходимых для восстановления неврологического дефицита. Эти воздействия должны быть направлены на различные процессы, связанные с индукцией ОСК опухолей мозга. По мнению S. Hedjiraneyis, E. Meir [62], уже сегодня следует рассматривать как минимум 6 терапевтических стратегий, приводящих к стимуляции дифференцировки ОСК, разрушению физиологических ниш, подавлению миграционной способности и химиорезистентности ОСК, иммуно- и вирусонколитической терапии. Например, дифференцировка ОСК связана с воздействием BMP-протеинов (bone morphogenetic proteins), которые относятся к семейству цитокинов, регулируют дифференциацию нормальных стволовых клеток [85, 86], в том числе являются промоторами пролиферации и дифференцировки НСК. Обработка одним из белков этого семейства (а именно BMP-4) CD133⁺ ОСК приводила *in vitro* к уменьшению их числа и торможению пролиферации. Введение этого белка животным с опухолями, вызванными введением CD133⁺-клеток, способствовало торможению роста опухоли, уменьшению инвазивности

и инфильтративного роста опухоли. Обработанные BMP-4 *in vitro* CD133⁺-клетки при введении в мозг иммунодефицитным животным вызывали рост опухолей меньшего размера, состоявших из более зрелых и менее инвазивных клеток [87, 88]. Перспективным способом воздействия на ОСК в физиологических нишах является разрушение их сосудистой сети [89]. Применение антител против фактора роста эндотелия сосудов (антиVEGF) или ингибитора тирозинкиназного рецептора VEGF было эффективно у больных с глиобластомами [90]. Антитела к VEGF практически не влияли на сами ОСК, но на способность эндотелиальных клеток капилляров воспринимать секретируемый ОСК-фактор роста оказывали действие. Вследствие этого тормозилась миграция эндотелиальных клеток и образование капилляров [91]. Перспективным может быть использование воздействий на стромальные клетки, представленные достаточно широко в опухолевой ткани; механизм взаимодействия ОСК и стромальных клеток практически не изучен, хотя известно, что стромальные клетки могут вырабатывать факторы роста и поддерживать опухолевую прогрессию.

Наличие в опухоли различных типов опухолевых клеток, в частности иницирующих и дифференцированных, предопределяет необходимость направлять усилия на все эти клетки, используя их как мишени для терапии [62, 69, 92]. Выявление ОСК с иницирующими свойствами и их идентификация дадут более полную картину об их локализации, миграции и эффективности терапии, направленной против них. Большие надежды возлагаются на нанотехнологии, которые способны захватывать токсические агенты или создавать локальную гипертермию в опухоли [93, 94]. По-видимому, в ближайшем будущем будут разработаны разные методы воздействия на ОСК.

В заключение необходимо отметить, что теория ОСК является весьма перспективной для онкологии, особенно нейроонкологии. Она позволяет отойти от устоявшихся догм о природе опухолей и о причинах неэффективности различных методов лечения при глиобластомах в связи с их быстрым инвазивным ростом, рецидивированием и резистентностью к химио- и лучевой терапии. Если, например, ОСК, вышедшие из первичного очага опухоли, посредством терапевтических агентов превратятся в дифференцированную популяцию клеток, которая не сможет мигрировать в отдаленные от опухоли участки мозга, то такие клетки не смогут вызывать рост повторной опухоли и не будет продолженного роста или рецидива. Выделив популяцию ОСК из опухоли, можно воспроизвести последнюю у иммунодефицитных животных, что является лабораторной моделью и для широкого поиска и изучения эффективности различных методов лечения, и для последующего изучения свойств ОСК. [62, 86]. Дальнейшие исследования по этой проблеме, возможно, позволят найти эффективные схемы лече-

ния такого инкурабельного заболевания, как злокачественные глиомы головного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Bonnet D, Dick JE.** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; **3**: 730–7.
2. **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**: 105–11.
3. **Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al.** Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; **63**: 5821–8.
4. **Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, et al.** Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2004; **14**: 43–7.
5. **Wicha MS, Liu S, Dontu G.** Cancer stem cells: an old idea – a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; **66**: 1883–90.
6. **Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al.** Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100** (25): 15178–83.
7. **Wang JC, Lapidot T, et al.** High level engraftment of NOD/SCID mice by primitive normal and leukaemic hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase. *Blood* 1998; **91**: 2406–14.
8. **Pardal R, Clarke M, Morrison S.** Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 895–902.
9. **Tu SM, Lin SH, Logothetis CJ.** Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol* 2002; **3** (8): 508–13.
10. **Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al.** Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; **445**: 111–15.
11. **Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al.** Characterization of CD133+hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **351**: 820–4.
12. **Eramo A, Lotti F, Sette G, et al.** Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 504–14.
13. **Tang NG, Patvarol L, et al.** Prostate cancer stem/progenitor cells: Identification, characterization, and implications. *Mol Carcinog* 2007; **46**: 1–14.
14. **Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al.** Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; **432**: 396–400.
15. **Tang NG, Park CY, Ailles LE, et al.** The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest* 2006; **86**: 1203–7.
16. **Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al.** Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; **64**: 7011–21.
17. **Dietrich J, Imitola J, Kesari S.** Mechanisms of disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; **5** (7): 393–404.
18. **Зозуля ЮА, Васильева ИГ, Главацкий АЯ и др.** Глиомы головного мозга. Киев: Уипк «ЕксОб», 2007; 630 с.
19. **Wen PY, Kesari S.** Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; **359** (5): 492–507.
20. **McGirt MJ, Chaichana KL, Attenello FJ, et al.** Extent of surgical resection is independently associated with survival in patients with hemispheric infiltrating low-grade gliomas. *Neurosurgery* 2008; **63** (4): 700–5.
21. **Beier D, Röhrl S, Pillai DR, et al.** Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* 2008; **68** (14): 5706–15.
22. **Holland EC.** Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci* 2000; **97** (12): 6242–4.
23. **Chaichana KL, McGirt MJ, Frazier J, et al.** Relationship of glioblastoma multiforme to the lateral ventricles predicts survival following tumor resection. *J Neurooncol* 2008; **89** (2): 219–24.

24. **Shaw E, Arusell R, Scheithauer B, et al.** Prospective randomized trial of low-versus high-dose radiation therapy in adults with supratentorial low-grade glioma: initial report of a North Central Cancer Treatment Group/Radiation Therapy Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2002; **20** (9): 2267–76.
25. **Dandy W.** Removal of right cerebral hemispheres for certain tumors with hemiplegia: preliminary report. *JAMA* 1928; **90**: 823–5.
26. **DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, et al.** Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol* 1998; **44** (4): 691–5.
27. **Karim AB, Maat B, Hatlevoll R, et al.** A randomized trial on dose-response in radiation therapy of low-grade cerebral glioma: European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; **36** (3): 549–56.
28. **Fecci P, Mitchell D, Whitesides J, et al.** Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 2006; **66** (6): 3294–302.
29. **Лисяний НН.** Изменение иммунных реакций при различных видах глиом. В: Глиомы головного мозга / Под ред акад ЮА Зозули / Киев: УИПК «ЕксОб», 2007: 235–52.
30. **Uchida N, Buck DW, He D, et al.** Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000; **97**: 14720–5.
31. **Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al.** A distinct «side population» of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 14228–33.
32. **Aboody KS, Brown A, Rainov NG, et al.** Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci* 2000; **97** (23): 12846–51.
33. **Yuan X, Curtin J, Xiong Y, et al.** Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004; **23**: 9392–400.
34. **Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laflamme C, et al.** Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol Cancer Res* 2008; **6** (6): 907–16.
35. **Xu F, Zhu JH.** Stem cells tropism for malignant gliomas. *Neurosci Bull* 2007; **23** (6): 363–9.
36. **Hakamura K, Ito Y, Kawano Y, et al.** Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 2004; **11** (14): 1155–64.
37. **Xu F, Zhu JH.** Stem cells tropism for malignant gliomas. *Neurosci Bull* 2007; **23** (6): 363–9.
38. **Sun L, Lee J, Fine HA.** Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J Clin Invest* 2004; **113** (9): 1364–74.
39. **Serfozo P, Schlarman MS, Pierret C, et al.** Selective migration of neuralized embryonic stem cells to stem cell factor and media conditioned by glioma cell lines. *Cancer Cell Int* 2006; **6**: 234–8.
40. **Widera D, Holtkamp W, Entschladen F, et al.** MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol* 2004; **83** (8): 381–7.
41. **Heese O, Disko A, Zirkel D, et al.** Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro Oncol* 2005; **7** (4): 476–84.
42. **Kendall SE, Najbauer J, Johnston HF, et al.** Neural stem cell targeting of glioma is dependent on phosphoinositide 3-kinase signaling. *Stem Cells* 2008; **26** (6): 1575–86.
43. **Schmidt NO, Przylecki W, Yang W, et al.** Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor. *Neoplasia* 2005; **7** (6): 623–9.
44. **Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, et al.** Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol* 2006; **199** (2): 301–10.
45. **Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, et al.** Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 2002; **1** (3): 269–77.
46. **Rafii S, Lyden D.** Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; **9** (6): 702–12.
47. **Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, et al.** Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 2005; **105** (1): 40–8.
48. **Ries C, Egea V, Karow M, et al.** MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 2007; **109** (9): 4055–63.
49. **Ehteshami M, Yuan X, Kabos P, et al.** Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4. *Neoplasia* 2004; **6** (3): 287–93.
50. **Rubin JB, Kung AL, Klein RS, et al.** A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci* 2003; **100** (23): 13513–8.
51. **Liang Z, Wu T, Lou H, et al.** Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 2004; **64** (12): 4302–8.
52. **Sakariassen PO, Immervoll H, Chekenya M.** Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in brain tumors: status and controversies. *Neoplasia* 2007; **9**: 882–92.
53. **Stiles CD, Rowitch DH.** Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron* 2008; **58** (6): 832–46.
54. **Dressel R, Schindehütte J, Kuhlmann T, et al.** The Tumorigenicity of Mouse Embryonic Stem Cells and In Vitro Differentiated Neuronal Cells Is Controlled by the Recipients' Immune Response. *PLoS ONE* 2008; **3** (7): 2622–34.
55. **Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al.** Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; **418**: 50–6.
56. **Thinyane K, Baier PC, Schindehütte J, et al.** Fate of pre-differentiated mouse embryonic stem cells transplanted in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats: histological characterization of the grafted cells. *Brain Res* 2005; **1045**: 80–7.
57. **Fair JH, Cairns BA, Lapaglia MA, et al.** Correction of factor IX deficiency in mice by embryonic stem cells differentiated in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 2958–63.
58. **Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, et al.** CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS One* 2008; **3** (11): 3655–61.
59. **Kolossov E, Bostani T, Roell W, et al.** Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006; **203**: 2315–27.
60. **Erdö F, Buhrle C, Blunk J, et al.** Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; **23**: 780–5.
61. **Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, et al.** Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem Cells* 2006; **24**: 763–71.
62. **Hadjipanayis CG, Van Meir EG.** Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *J Mol Med* 2009; **87** (4): 363–74.
63. **Wang J, Wang H, Li Z, et al.** c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS One* 2008; **3** (11): 3769–76.
64. **Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laflamme C, et al.** Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol Cancer Res* 2008; **6** (6): 907–16.
65. **Bao S, Wu Q, Li Z, et al.** Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res* 2008; **68** (15): 6043–8.

66. Kosztowski T, Zaidi H, Quiñones-Hinojosa A. Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; **9** (5): 597–612.
67. Ligon KL, Huillard E, Mehta S, *et al.* Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 2007; **53**: 503–17.
68. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; **21**: 2683–710.
69. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 2006; **9**: 391–403.
70. Holland EC, Celestino J, Dai C, *et al.* Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 2000; **25**: 55–7.
71. Barnett SC, Robertson L, Graham D, *et al.* Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells transformed with c-myc and H-ras form high-grade glioma after stereotactic injection into the rat brain. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 1529–37.
72. Guo AM, Sheng J, Scicli GM, *et al.* Expression of CYP4A1 in U251 human glioma cell induces hyperproliferative phenotype in vitro and rapidly growing tumors in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; **327** (1): 10–9.
73. Sonoda Y, Ozawa T, Hirose Y, *et al.* Formation of intracranial tumors by genetically modified human astrocytes defines four pathways critical in the development of human anaplastic astrocytoma. *Cancer Res* 2001; **61**: 4956–60.
74. Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, *et al.* Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* 2001; **61**: 6674–8.
75. Ishii N, Tada M, Hamou MF, *et al.* Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor. *Oncogene* 1999; **8**: 5870–8.
76. Beier D, Röhrl S, Pillai DR, *et al.* Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* 2008; **68** (14): 5706–15.
77. Nandi S, Ulasov IV, Tyler MA, *et al.* Low-dose radiation enhances survivin-mediated virotherapy against malignant glioma stem. *Cancer Res* 2008; **68** (14): 5778–84.
78. Zhang M, Song T, Yang L, *et al.* Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; **27**: 85–92.
79. Joo KM, Kim SY, Jin X, *et al.* Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest* 2008; **88** (8): 808–15.
80. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, *et al.* Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2-cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005; **65**: 6207–11.
81. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 781–6.
82. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, *et al.* Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997; **3**: 1337–45.
83. Harris MA, Yang H, Low BE, *et al.* Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma. *Cancer Res* 2008; **68**: 10051–9.
84. Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol* 2005; **45**: 872–7.

85. Panchision DM, McKay RD. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**: 478–87.

86. Nakano I, Saigusa K, Kornblum HI. BMPing off glioma stem cells. *Cancer Cell* 2008; **13**: 3–4.

87. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, *et al.* Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 2006; **444**: 761–5.

88. Lee J, Son MJ, Woolard K, *et al.* Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* 2008; **13**: 69–80.

89. Gilbertson RJ, Rich JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 733–6.

90. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, *et al.* A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007; **11**: 69–82.

91. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, *et al.* Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2006; **66**: 7843–8.

92. Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res* 2007; **67**: 8980–4.

93. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, *et al.* Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2007; **81**: 53–60.

94. Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, *et al.* The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol* 2006; **78**: 7–14.

STEM TUMOR CELLS MALIGNANT GLIOMAS

N.I. Lisyanyi, A.N. Lisyanyi

Summary. *The article present the latest dates about tumor stem cells which were identified in malignant gliomas. Tumor stem cells have similar capacities to normal neural stem cells of brain. They express CD133⁺ marker molecule and are able to migrate and penetrate from tumor into the normal tissue. They cause recidives and recurrent tumor growth. These tumor stem cells are chemically and radio resistant and they lead to tumor growth in immunodeficiency animals in the experiments. Tumor stem cells are a new subject for investigation and development of new treatment strategies gliomas brain.*

Key Words: neural stem cells, tumor stem cells, gliomas, glioblastomas, CD133⁺ cells.

Адрес для переписки:

Лисяный Н.И.

Институт нейрохирургии

Тел./факс: +38 (044) 483-81-93,

моб. тел.: +38 (067) 595-34-36