УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ КОРРЕЛЯТЫ МЕХАНИЗМОВ ОБОСОБЛЕННОГО И КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИСПЛАТИНА, ТЕМОЗОЛОМИДА, ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ В КЛЕТКАХ АСТРОЦИТОМЫ И МЕДУЛЛОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Чернов А. Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Чернов Александр Николаевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 194156.
E-mail: al.chernov@mail.ru

Статья поступила в редакцию 02.02.2019
и принята к печати 12.03.2019.

Резюме

В статье изучены ультраструктурные особенности гибели в первичной культуре клеток пилоцитарной астроцитомы (ПА) и медуллобластомы (МБ) человека при изолированном и комбинированном воздействии цисплатина, темозоломида и фактора роста нервов (ФРН). Применение цисплатина индуцировало гибель по типам некроза и апоптоза клеток ПА и МБ соответственно. Воздействие темозоломида вызывало гибель по типу некроза клеток ПА и МБ. ФРН стимулировал гибель по типам некроза и апоптоза клеток ПА и по типам некроза, смешанного в клетках МБ. При воздействии комбинации ФРН с цисплатином наблюдалось увеличение ($p < 0,05$) некротических клеток ПА и МБ относительно обособленного воздействия ФРН и цисплатина на клетки ПА, и цисплатина на клетки МБ. При воздействии комбинации ФРН + темозоломид наблюдалось усиление гибели по смешанному типу клеток ПА и МБ относительно обособленного воздействия ФРН и темозоломида. Данные типы гибели (некроз и смешанный) являются более разрушительными на уровне субклеточных органелл, чем апоптоз, что позволяет в перспективе подбирать комбинации химиопрепаратов, обладающие более сильным цитостатическим противоопухолевым эффектом.

Ключевые слова: фактор роста нервов, цисплатин, темозоломид, комбинация фактора роста нервов с химиопрепаратами, пилоцитарная астроцитома, медуллобластома, электронная микроскопия.

Для цитирования: Чернов А.Н. Ультраструктурные корреляты механизмов обособленного и комбинированного действия цисплатина, темозоломида, фактора роста нервов в клетках астроцитомы и медуллобластомы человека. Трансляционная медицина. 2019;6(1): 27–42.

ULTRASTRUCTURAL CORELATIONS OF CYCPLATIN, TEMOZOLOMIDE, NERVE GROWTH FACTOR MECHANISMS OF ISOLATED AND COMBINED ACTION ON HUMAN ASTROCYTOMA AND MEDULLOBLASTOMA CELLS

Chernov A. N.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Chernov Aleksandr N.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: al.chernov@mail.ru

Received 02 February 2019;
accepted 12 March 2019.

Abstract

The isolated and combined cisplatin, temozolomide and nerve growth factor (NGF) effects on the ultrastructural death features of human pilocytic astrocytoma (PA) and medulloblastoma (MB) primary cell cultures were studied. Cisplatin induced necrosis and apoptosis death of PA and MB cells respectively. Temozolomide caused necrosis death of PA and MB cells. NGF stimulated necrosis and apoptosis death of PA cells and necrosis and mixed type death in MB cells. The NGF and cisplatin combination effect increased ($p < 0.05$) necrotic PA and MB cells relative to NGF and cisplatin isolated effect on PA cells and cisplatin on MB cells. The NGF and temozolomide combination effect increased mixed death of PA and MB cells relative to NGF and temozolomide isolated act. Necrosis and mixed death types are more destructive at the subcellular organelles level than apoptosis, which allows in the long term to select combinations of chemotherapy drugs that have a stronger cytostatic anticancer effect.

Key words: nerve growth factor, cisplatin, temozolomide, combination of nerve growth factor with chemotherapy, pilocytic astrocytoma, medulloblastoma, electron microscopy.

For citation: Chernov AN. Ultrastructural Corelations of Cycplatin, Temozolomide, Nerve Growth Factor Mechanisms of Isolated and Combined Action on Human Astrocytoma and Medulloblastoma Cells. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2019;6(1): 27–42. (In Russ.)

Повышение эффективности терапии новообразований центральной нервной системы с использованием стандартных подходов сталкивается с рядом препятствий: локализацией опухолей вблизи жизненно важных центров и возможностью их повреждения в ходе резекции; проницаемостью гематоэнцефалического барьера для химиопрепаратов и снижению их концентраций; побочными реакциями химиопрепаратов на организм пациента при системном применении с повреждением интактных клеток; большой вариабельностью протоколов химиотерапии, не учитывающей индивидуальную чувствительность неоплазий к препаратам; недостаточной изученностью механизмов действия химиопрепаратов на субклеточном уровне с целью создания оптимальных их комбинаций,

взаимодополняющих повреждающее действие на опухоль. Одним из ряда просматриваемых подходов к решению указанных проблем служит вовлечение в онкобиологию класса эндогенных мультифункциональных биорегуляторов пептидной природы — ростовых факторов, насчитывающих в своем составе ряд семейств, охватывающих более 90 представителей [1], в том числе нейротрофинов, куда входит фактор роста нервов (ФРН) [2, 3]. Его уникальность в том, что, с одной стороны, в пре- и раннем постнатальном онтогенезе он контролирует рост, развитие, дифференцировку и выживаемость нейрональных и глиальных клеток центральной и периферической нервной системы. В зрелости, в силу нейротрофических свойств, он поддерживает их фенотипический статус, усиливая

ет противостояние различным по природе повреждающим воздействиям и стимулирует репаративно-регенеративные процессы.

Предыдущие наблюдения автора констатировали, что применение ФРН в культурах неопластических клеток не только инициирует их гибель, удостоверяемую другими авторами [4], но и оказывает аддитивный эффект при комбинировании с химиопрепаратами [5]. За счет чего данный эффект достигается? Вероятная основа — неоднозначность механизмов действия препаратов и ФРН. В проверке данной версии уместно обратиться к электронно-микроскопическим особенностям гибели клеток опухолей посредством некроза, апоптоза, аутофагии и макропиноцитоза и др. [6, 7, 8, 9].

Это тем более так, если учесть, что существующие ультраструктурные исследования касаются лишь частичной оценки опухолевых клеток без комплексной характеристики повреждающего действия химиопрепаратов, что способствовало бы выявлению конкретных путей действия последних [10, 11, 12, 13, 14]. Отсюда целью данного исследования послужило выяснение особенностей изолированного применения цисплатина, темозоломида, ФРН и их комбинаций на клетки пилоцитарной астроцитомы (ПА) и медуллобластомы (МБ) человека, являющихся самыми распространенными (40 %) опухолями центральной нервной системы у пациентов детского возраста [15]. Средняя выживаемость пациентов при консервативном лечении составляет 14 недель, при хирургическом удалении и радиооблучении — 36, а при дополнении химиотерапией — 40–50 недель. Пятилетняя выживаемость пациентов составляет менее 5,5 % [16]. Опираясь на протоколы химиотерапии: HIT2000 [17], HIT-GBM-D [18] и данные литературы относительно механизмов действия фармакологических средств [19] и ФРН [2], исследовалось действие цисплатина и темозоломида, как наиболее часто применяющихся в терапии опухолей мозга химиопрепаратов.

Материалы и методы исследования

Исследованию подвергался биопсийный материал ПА и МБ, взятый во время хирургической операции пациентов ($n = 10$) в возрасте 5–15 лет, находившихся на лечении в городской клинической больнице скорой медицинской помощи г. Минска.

Кусочки ткани в стерильных условиях ламинарного бокса отмывали от крови, освобождали от соединительнотканых элементов в растворе Хенкса (Sigma-Aldrich, США), механически измельчали и подвергали ферментативной обработке с добавлением 0,25 % трипсина в версене (Sigma-Aldrich, США) и инкубации в течение 10 минут при 37 °C.

Далее материал переносили в чашки Петри ($d = 35$ мм, Nunc, Дания) с 3 мл среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, инкубировали на протяжении 2 суток в стандартных условиях CO₂-инкубатора (Heracell, США) при 37 °C, 95 % влажности и парциальном давлении 5 % CO₂ [20]. Спустя означенный период в среду на сутки вносили ФРН ($8,8 \times 10^{-9}$ М или 0,1 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США), цисплатин ($3,33 \times 10^{-7}$ М или 1 мкг/мл, тева, РФ), темозоломид ($1,03 \times 10^{-7}$ М или 2 мкг/мл, тева, РФ) или их комбинации с десятикратно сниженной дозой химиопрепаратов (0,1 + 0,1 или 0,1 + 0,2 мкг/мл). В последующем образцы обрабатывали согласно известной в электронной микроскопии методике [21] в авторской модификации. Кусочки опухолевой ткани на 24 часа погружали в 4 % раствор глутаральдегида (Sigma-Aldrich, США) на фосфатном буфере (pH = 7,2). После трехкратного промывания буфером выдерживали в течение 3 часов в 2 % растворе четырехоксида осмия. Далее, проведя образцы по спиртам возрастающей крепости (30°, 50°, 70° — 3 раза в каждом по 15 минут), до ночи (на ночь или до ночи?) выдерживали в (пропуск?) при 4 °C в растворе уранилацетата (Sigma-Aldrich, США), приготовленном на 70° спирте. Ткань таким же образом последовательно переносили в 96°, абсолютный спирт, ацетон и помещали в термостат при 37 °C в тигли со смесью равных объемов ацетона, аралдитов М и Н, а через несколько часов — в тигли со смесью равных объемов аралдитов М и Н. Затем образцы раскладывали в капсулы и для полимеризации заливали смесью аралдитов М и Н с добавлением катализатора (0,1 % от объема смеси), и помещали в термостат последовательно на 1 сутки при 37 °C, на 1 сутки — при 48 °C, на 5 суток — при 56 °C, на 3 суток — при 90 °C. Капсулы с материалом резали на ультрамикротоме LKB (Швеция), срезы контрастировали по методу Рейнольдса цитратом свинца (Sigma-Aldrich, США) и просматривали под электронным микроскопом JEM — 100 CX (Япония) при увеличениях $\times 4800$, 7200 , 9800 , 10000 и 14400 . В каждой серии получали срезы от 5 блоков и изучали по 25–75 микрофотографий. Количественный анализ включал суммарные вертикальные и горизонтальные диаметры, параметры площадей (планиметрия) клеток, их ядер, ядрышек, эндоплазматического ретикулума, митохондрий, комплекса Гольджи, липидных капель, вакуолей, ядерного хроматина, первичных и вторичных лизосом, пиносом с вычислением ядерно-цитоплазматических соотношений и участков лизиса. Все измерения проводили с использованием компьютерной программы Image J (версия 1.38r). Достоверность различий между

средними величинами, полученными в контроле и опытах, устанавливали по критерию Манна–Уитни для непараметрических выборок с привлечением программы StatPlus 2005. Результаты признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Чтобы оценить типы гибели клеток опухолей (апоптоз, некроз, аутофагия, макропиноцитоз и смешанные типы), автор использовал наиболее типичные их ультраструктурные признаки. Критерии апоптоза были следующие:

1. Уменьшение размеров клеток, теряющих 1/3 объема из-за нарушения транспорта ионов и воды, их ядер и ядрышек.
2. Сохранение плазмалеммы и мембран оргanelл в клетках благодаря их «усыханию», утрате непосредственных контактов друг с другом.
3. Гиперконденсация и маргинация распадающегося на глыбки хроматина ядер, деформация и фрагментация которых за счет ядерных белков приводит к разрывам мембран и выходу в цитоплазму молекул, вызывающих деструкцию оргanelл.
4. Неровность контуров ядра, приобретающего лопастный вид с последующим коллапсом и распадом на микроядра.
5. Мембранное пузырение («блеbbing»).
6. Образование апоптотических тел.
7. Изменение формы прилегающих к ядру митохондрий и уплотнение их матрикса.
8. Вакуолизация цитоплазмы и распад ее на дискретные структуры.
9. Расширение цистерн эндоплазматического ретикулума.
10. Агрегация рибосом в кристаллоподобные структуры.
11. Разрушение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), распад клеток на окруженные мембранами плотные образования [6, 9, 22, 23].

Признаки некроза были следующие:

1. Набухание клеток по причине отека оргanelл.
2. Разрывы наружной мембраны, ведущие к активации лизосомальных ферментов.
3. Вакуолизация цитоплазмы, приводящая к формированию одной крупной или нескольких мелких вакуолей.
4. Образование липидных капель.
5. Разрушение ядра (кариолизис), сочетающееся с распадом цитоплазмы на поздних стадиях процесса.
6. Умеренная конденсация хроматина или ее отсутствие.
7. Гипертрофия, измененных по форме митохондрий, с просветлением матрикса в силу кристолизиса [6, 10, 22, 23].

Аутофагию характеризовали: вакуолизация цитоплазмы, связанная с появлением сдвоенных мембранных вакуолей — аутофагосом, которые объединялись с эндоцитотическими компартментами и лизосомами, чему способствовало присутствие на их мембране; увеличение активности лизосом; сохранение целостности плазмалеммы; исчезновение, частичная конденсация хроматина или пикноз ядра; деградация эндоплазматического ретикулума, комплексов Гольджи, липидных капель; гипертрофия митохондрий, усиление их проницаемости, просветление матрикса по причине кристолизиса; отсутствие фрагментации ядра и клетки на поздних стадиях гибели; длительное сохранение микротрубочек и промежуточных микрофиламентов [7, 8, 9, 23].

Макропиноцитоз [24] рассматривается как очередной (помимо апоптоза и аутофагии) каспазо-независимый механизм гибели клеток, включающий: образование крупных (до 5 мкм) одиночных вакуолей — макропиноцитом вследствие неспецифического поглощения ламеллоподиями экстрацеллюлярных капель жидкости и малых молекул; минорную деструкцию ДНК.

Количественный анализ включал параметры площадей (планиметрия) ядер, ядрышек, эндоплазматического ретикулума, митохондрий, комплексов Гольджи, липидных капель, вакуолей, конденсированного хроматина, первичных и вторичных лизосом, пиносом с вычислением ядерно-цитоплазматических соотношений и участков лизиса. Учитывали электронную плотность отдельных оргanelл. Все измерения проводили с использованием программы ImageJ (версия 1.38r). Подсчитывали количество клеток с конденсированным и фрагментированным хроматином, вычисляя процент апоптотических клеток — абсолютный апоптотический индекс (ААИ) по формуле:

$$\text{ААИ} = (\text{число апоптотических клеток} / \text{общее число погибших клеток}) \times 100 \%$$

Такого рода показатели рассчитывали для некротических и клеток, погибших по смешанному типу (абсолютные некротические, смешанного типа индексы).

Результаты и их обсуждение

В ходе выполнения экспериментов и основываясь на использовании вышеприведенных критериев, установлено, что цисплатин, темозоломид, ФРН и их комбинации индуцируют широкий спектр изменений ультраструктуры клеток ПА, МБ, которые относятся к апоптотическим, некротическим, сме-

шанным (апоптотически-некротическим) и аутофагальным типам гибели.

В контрольных посевах 44 % клеток ПА оставались жизнеспособными, тогда как 6,9 % погибало в результате апоптоза, 39,1 % — некроза и 10 % — макропиноцитоза (рис. 1).

Субклеточная организация клеток ПА в контроле характеризовалась наличием неповрежденной плазмалеммы, крупного овального, центрально расположенного ядра с периферически локализованным конденсированным гетерохроматином и одним ядрышком. Одиночные, продолговатые митохондрии с типичной структурой матрикса и крист находились перинуклеарно. Цистерны эндоплазматического ретикулума, комплексы Гольджи, липидные

капли и участки лизиса цитоплазмы не были визуализированы. Отмечали небольшие вакуоли, первичные, вторичные лизосомы и пиносомы.

К особенностям ультраструктуры клеток, погибших по типу апоптоза, относили уменьшение площадей округленных ядер, увеличение конденсации гетерохроматина, редукцию ядрышек. Данного рода изменения приводили к понижению показателей ядерно-цитоплазматического соотношения. В 3,4 % проанализированных электроннограмм имело место «пузырение» ядра (блеббинг). Этому процессу предшествовали округление митохондрий, конденсация матрикса с хаотично расположенными кристами, перинуклеарная, а на поздних этапах — внутриядерная их локализация [10]. Происходило

Рис. 1. Микрофотография клетки ПА в контрольной серии, односуточная культура, $\times 7200$

Рис. 2. Микрофотография клетки пилоцитарной астроцитомы в контрольной серии, погибшей по типу макропиноцитоза, односуточная культура, $\times 7200$

открытие пор мембранных каналов митохондрий, выход в цитоплазму и проникновение в ядро каспаз [6], что вело в 2 % электроннограмм к его деградации лизо- и фагосомами [25]. В 2 % электроннограмм пилотарной астроцитомы наблюдали апоптотические тела, содержащие «осколки» ядер, липидные капли и вакуоли. Констатировали гиперплазию цистерн эндоплазматического ретикулума и комплексов Гольджи, локализующихся вблизи ядра. Наблюдали округление митохондрий, матрикс их становился электронно-плотным. В одной клетке обнаружены две полимембранные митохондрии с редукцией крист, что связано с отсутствием *e* и *g* субъединиц АТФ-азы [10].

Исследователи [24] выделяют макропиноцитоз в качестве особой формы гибели, который был документирован в 10 % электроннограмм контроля (рис. 2).

При данной форме гибели наблюдали сохранение целостности мембраны, как и в апоптотических клетках, но с появлением инвагинации и сегрегации ядра, как при некрозе. Конденсация хроматина варьировалась в широком диапазоне: от отсутствия в 50 % электроннограмм до занимаемой им 55 % площади других ядер. Ядрышки визуализировали в 25 % клеток, а их площади превосходили таковые в неповрежденных, погибших по типам апоптоза и некроза клетках контроля. Морфометрические показатели липосом, вакуолей и крупных пиноцитарных пузырьков достигали наибольших величин по сравнению с неповрежденными и погибшими по всем типам клетками контроля.

Воздействие ФРН на клетки ПА стимулировало в 19 % электроннограмм их апоптоз, в 57,1 % — некроз (рис. 3), в 9,4 % — аутофагию и в 14,5 % — смешанный тип гибели. Апоптотическими осо-

Рис. 3. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при односуточном воздействии ФРН ($8,8 \times 10^{-9}$ М), $\times 14500$

Рис. 4. Микрофотография погибшей по типу аутофагии клетки ПА при односуточном воздействии ФРН ($8,8 \times 10^{-9}$ М), $\times 14500$

бенностями клеток являлись: увеличение степени конденсации хроматина ядер и ядерно-цитоплазматического соотношения, снижение площадей, занятых митохондриями, липидными каплями, вакуолями и первичными лизосомами.

Отличительным признаком ультраструктуры клеток ПА, погибших по типу некроза, являлся тотальный лизис цитоплазмы, ядер, митохондрий, вакуолей, липидных капель, цистерн эндоплазматического ретикулума и комплексов Гольджи.

К отличительным признакам гибели по смешанному типу клеток новообразования при добавлении ФРН относили повышение до 92,7 % степени конденсации хроматина ядра, присутствие мелких, прозрачных кластриновых везикул.

В результате аутофагии клеток ПА при воздействии ФРН (рис. 4) наблюдалась полная деструкция хроматина ядра и 67,8 % площади цитоплазмы клетки, снижение показателей ядерно-цитоплазматического соотношения. Появлялись двухмембранные аутофагосомы, сливающиеся с первичными и вторичными лизосомами. Митохондрии имели округлую и эллипсоидную формы, прозрачный матрикс вследствие частичного или полного кристолизиса и локализовались перинуклеарно.

Автор документировал отсутствие липидных капель, цистерн эндоплазматического ретикулума и комплексов Гольджи. Сходная картина описана исследователями [9] на DAOY-клетках МБ человека при воздействии ФРН и экспрессии TrkA-рецепторов, стимулирующих образование аутофагосом.

В литературе отмечается отрицательное значение аутофагии, которая является причиной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, усиливая их пролиферацию и выживание за счет блокады апоптоза и активации гуанидин трифосфатаз — ГТФаз, PI3K, транскрипционного фактора E2F, Bcl-2 и онкогенов *PTEN*, *MYC* [9].

Воздействие цисплатина на клетки ПА индуцирует их гибель по типу апоптоза в 32 % электроннограмм, некроза — 60 % и смешанному типу — 8 % клеток (рис. 5).

При некрозе отмечали широкий спектр изменений формы митохондрий (округлой, изогнутой, продолговатой и т. д.) с просветленным матриксом. Наблюдала возрастные области, занятые вторичными лизосомами. Документировали снижение площадей, измененных по форме, сегрегированных ядер, показателей ядерно-цитоплазматического соотношения, появление липидных капель.

К особенностям ультраструктуры погибших по смешанному типу клеток ПА при воздействии цисплатина относили повышение степени конденсации хроматина до 100 % и участков первичных лизосом, липидных капель, вакуолей и цитоллиза. Отмечали снижение площадей смещенных к периферии клеток, измененных по форме ядер, ядерно-цитоплазматического соотношения, деградиацию ядрышек. Митохондрии с просветленным матриксом и кристолизисом были удалены от них.

Применение комбинации ФРН + цисплатин ($3,33 \times 10^{-7}$ М) вызывало гибель клеток опухоли по типу некроза в 85,7 % электроннограмм (рис. 6), смешанному типу — в 9,5 % и апоптоза — в 4,7 %.

Например, при некрозе опухолевых клеток, обработанных комбинацией ФРН + цисплатин (рис. 6), на ультраструктурном уровне констатировали смещение ядер с мелкозернистым и гипоконденсированным хроматином и распадом ядрышек к периферии клетки, что указывает на нарушения цитоскелета в цитоплазме [25]. Визуализировали увеличение участков, занятых вакуолями, лизосомами, цитоллизом и липидными каплями. Численность последних колебалась от одной гигантской до нескольких десятков на клетку.

Рис. 5. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при односуточном воздействии цисплатина ($3,33 \times 10^{-6}$ М), $\times 14400$

К особенностям ультраструктуры апоптотических клеток пилочитарной астроцитомы при воздействии комбинации реагентов относили гиперконденсацию до 92,8 % хроматина ядра по сравнению с клетками при раздельном влиянии химиопрепарата и ФРН, отсутствие кариорексиса и разрывов нуклеолеммы.

Ультраструктурным признаком погибших по смешанному типу клеток пилочитарной астроцитомы при комбинированном воздействии ФРН + цисплатин являлось снижение показателей ядерно-цитоплазматического соотношения. Остальные изменения — уменьшение площадей ядер с 54%-ной конденсацией гетерохроматина, электронно-плотных митохондрий, деградация ядрышек — не отличались от таковых в апоптотических клетках при обработке ФРН. Как в клетках, погибших по смешанному типу под воздействием цисплатина, была выявлена гиперплазия цистерн эндоплазматического ретикулума.

Воздействие темозоломида на клетки ПА индуцировало их гибель по типу некроза в 80 % электроннограмм и смешанному типу — в 20 %. К ультраструк-

турным особенностям некротических клеток (рис. 7) относили снижение площадей ядер с гипоконденсированным хроматином и показателей ядерно-цитоплазматического соотношения. Наблюдали гиперплазию и увеличение площадей цистерн эндоплазматического ретикулума, митохондрий неправильной формы с частичным кристоллизисом, липидных капель и вакуолей, малых и крупных пиносом. Отмечали появление двухмембранных электронно-плотных везикул и участков лизиса цитоплазмы.

К ультраструктурным признакам погибших по смешанному типу клеток пилочитарной астроцитомы при воздействии темозоломида относили снижение площадей, занятых электронно-плотными митохондриями с неправильным расположением крист, увеличение численности первичных лизосом, что указывало на интенсивно протекающий процесс фагоцитоза.

Применение комбинации ФРН + темозоломид ($1,03 \times 10^{-7}$ М) приводило к гибели опухолевых клеток по типу некроза — в 75 % и смешанному типу — в 25 % электроннограмм.

Рис. 6. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при односуточном воздействии комбинации ФРН ($8,8 \times 10^{-9}$ М) с цисплатином ($3,33 \times 10^{-7}$ М), $\times 9800$

Рис. 7. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при односуточном воздействии темозоломида ($10,3 \times 10^{-6}$ М), $\times 10000$

Ультраструктурными особенностями клеток пиллоцитарной астроцитомы, погибших по типу некроза при нанесении комбинации ФРН + темозоломид (рис. 8), были снижение показателей ядерно-цитоплазматического соотношения до 9,0 % и площадей, занятых митохондриями с лизированным матриксом и кристами. Области цитолиза цитоплазмы, вакуолей и липидных капель имели промежуточные значения среди некротических клеток в контроле и при воздействии темозоломида.

К ультраструктурным признакам клеток ПА, погибших по смешанному типу при обработке комбинацией ФРН + темозоломид, принадлежало наличие относительно крупного ядра неправиль-

ной формы с конденсированным гетерохроматином по площади меньшей, чем в жизнеспособных клетках контроля, и крупнее, чем в некротических клетках при обособленном и комбинированном воздействии соответственно темозоломида и ФРН. Наблюдали крупные области лизиса цитоплазмы больше, чем в некротических клетках при применении комбинаций реагентов, и погибших по смешанному типу при обособленном воздействии темозоломида.

Численность клеток ПА, погибших по разным типам, при воздействии цисплатина, темозоломида, ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами представлена в таблице 1.

Рис. 8. Микрофотография клетки ПА, погибшей по типу некроза при односуточном воздействии комбинации ФРН ($8,8 \times 10^{-9}$ М) с темозоломидом ($10,3 \times 10^{-7}$ М), $\times 10000$

Таблица 1. Интенсивность спонтанных и индуцированных типов гибели клеток ПА при воздействии химиопрепаратов, ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами

Тип гибели	Процент погибших клеток (абсолютный апоптотический, некротический, смешанного типа индекс), %					
	Серия эксперимента					
	Контроль	Цисплатин	ФРН + цисплатин	Темозоломид	ФРН + темозоломид	ФРН
Апоптоз	$6,9 \pm 0,5(\#)$	$32,0 \pm 1,9(\#^{\wedge}\sqrt{ })$	$4,7 \pm 0,9(\dagger^{\circ}\#^{\wedge})$	—	—	$19,0 \pm 2,6(\#^{\wedge}\sqrt{ })$
Некроз	$39,1 \pm 2,6(*)$	$60,0 \pm 1,1(*^{\wedge}\sqrt{ })$	$85,8 \pm 1,4(*\dagger^{\circ}\#^{\wedge}\sqrt{ })$	$80,0 \pm 6,4(*^{\wedge}\sqrt{ })$	$75,0 \pm 4,8(*^{\circ}\#^{\wedge}\sqrt{ })$	$57,1 \pm 3,3(*^{\wedge}\sqrt{ })$
Смешанный тип	—	$8,0 \pm 0,8(*\#^{\wedge}\sqrt{ })$	$9,5 \pm 1,3(\#^{\wedge}\sqrt{ })$	$20,0 \pm 6,4(*\#^{\wedge}\sqrt{ })$	$25,0 \pm 4,8(^{\circ}\#^{\wedge}\sqrt{ })$	$14,5 \pm 1,7(\#^{\wedge}\sqrt{ })$

Примечание: знаками $\dagger$ и $^{\circ}$ обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия комбинированного от обособленного воздействия химиопрепарата и ФРН соответственно. Символы *, # и $^{\wedge}$ указывают на статистически значимые ($p < 0,05$) отличия численности клеток от погибших по типам апоптоза, некроза или смешанного соответственно при обособленном или комбинированном воздействии каждого реагента; символом $\sqrt{ }$ обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия в численности клеток, погибших по определенному типу гибели при воздействии химиопрепаратов, ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами, от гибели клеток по данному типу в контроле.

Клетки МБ с неповрежденной ультраструктурой встречались в 74,8 % электроннограмм контрольной серии, остальные погибали по типам: апоптоза — в 9,9 %, некроза — в 7,6 % и смешанному типу — в 7,6 %.

К особенностям ультраструктуры жизнеспособных клеток МБ (рис. 9) по сравнению с клетками астроцитомы были отнесены: удлинённые веретеновидные ядра, не содержащие гетерохроматина, имеющие до пяти крупных ядрышек, что свидетельствует об интенсивно протекающем биосинтезе белка.

Автор отмечал повышение ($p < 0,05$) до $78,2 \pm 2,3$ % показателей ядерно-цитоплазматического соотношения по сравнению с астроцитомой ($54,4 \pm 1,8$ %). Были выявлены липидные капли и области лизиса цитоплазмы. Отсутствовали вакуоли, мелкие и крупные пиносомы, цистерны эндоплазматического ретикулума и комплексы Гольджи.

Апоптотические клетки медуллобластомы в контрольной серии располагались группами по 3–5, формируя розетки Хомера Райта (рис. 10).

Отличительными признаками их ультраструктуры являлось уменьшение областей, лишенных нуклеолеммы и округлых ядер, численности ядрышек при повышении степени конденсации хроматина и показателя ядерно-цитоплазматического соотношения. В 11 % клеток на электроннограммах неправильной формы ядра имели глубокие инвагинации, сочетающиеся с кариорексисом, а на финальном этапе — кариолизисом. Отмечали наличие липидных капель вблизи или в самом ядре, появление вакуолей и первичных пиноцитарных пузырьков. Увеличивалась площадь везикул по сравнению с жизнеспособными клетками контроля.

Клетки МБ более устойчивы к некрозу (7,6 %), чем ПА (46 %). Отличительным признаком некроза для клеток медуллобластомы являлся мелкоглыб-

Рис. 9. Микрофотография клеток МБ в контрольной серии, односточная культура, $\times 7200$

Рис. 10. Микрофотография группы клеток медуллобластомы в контрольной серии, погибших по типу апоптоза, формирующих розетку Хомера Райта, $\times 7200$

Рис. 11. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу некроза в контрольной серии, односуточная культура, $\times 7200$

Рис. 12. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу некроза при воздействии ФРН, односуточная культура ($8,8 \times 10^{-9}$ М), $\times 14000$

чатый, гипоконденсированный эухроматин неправильной формы ядер с выпячиваниями, инвагинациями и кариорексисом. Вблизи ядер и в них, в цитоплазме присутствовали липидные капли (рис. 11).

Визуализировали области, занятые рибосомами и волокнистыми структурами, которые указывали на фибриллярный тип некроза. Возрастали площади липидных капель относительно жизнеспособных клеток контроля. Констатировали уменьшение вакуолей, везикул, лишённого нуклеолеммы ядра и численности ядрышек в сравнении с апоптотическими клетками.

К особенностям клеток медуллобластомы, погибших по смешанному типу, принадлежали 100 %-ая гиперконденсация хроматина ядра и деградация ядрышек. Не визуализировали митохондрий.

Наблюдали снижение площадей липидных капель и первичных лизосом относительно некротических клеток. Документировали увеличение областей, занятых рибосомами, лизосомами, цитоллизом и вакуолями относительно погибших по типу некроза клеток контроля. Как в жизнеспособных клетках контроля, исчезали первичные пиносомы.

Воздействие ФРН на клетки МБ вызывало их гибель в 9,2 % электроннограмм по типу апоптоза, в 69,3 % электроннограмм — по типу некроза (рис. 12) и в 21,5 % — по смешанному типу. Отличительными субклеточными признаками клеток МБ, погибших по типу апоптоза, являлось уменьшение площадей ядрышек и цитоллизиса относительно погибших по типу апоптоза клеток контроля. Констатировали гиперплазию цистерн эндоплазматического ретикулума.

ческого ретикулума, отсутствие липидных капель и появление участков полирибосом, что документировало интенсификацию биосинтеза, транспорта, посттрансляционных модификаций белков. Исчезали митохондрии, вторичные лизосомы, первичные и крупные пиносомы относительно погибших по смешанному типу клеток в контроле.

Особенностью некротических клеток МБ, погибших при воздействии ФРН (см. рис. 12), являлось более сильное снижение участков ядер, митохондрий и липидных капель относительно клеток контроля, погибших по типу некроза.

Автор наблюдал увеличение ($p < 0,05$) областей микрофиламентов относительно некротических клеток, составляющих их цитоскелет и являющихся ультраструктурным проявлением морфологической дифференцировки [26]. Возрастали площади, занятые цистернами эндоплазматического ретикулума, которые сочетались с уменьшением ($p < 0,05$) участков полирибосом по сравнению с апоптотическими клетками, что указывает на агранулярный тип эндоплазматической сети. Была выявлена деградация ядрышек, конденсированного гетерохроматина ядра, вторичных лизосом и пиносом. В результате проведения электронно-микроскопического исследования подобные везикулы обнаружены в эпендимоме [14], астробластоме [12] и злокачественной меланоме [11].

Отличительным признаком ультраструктуры погибших по смешанному типу клеток медуллобластомы при воздействии ФРН служило наличие ядрышек. Констатировали снижение площадей вакуолей и микрофиламентов по сравнению с клетками, погибшими по смешанной форме в контроле и по типу некроза при воздействии фактора роста нервов. Отсутствовали цистерны эндоплазматического ретикулума и участки цитолиза относительно апоптотических и некротических клеток при обработке фактором роста нервов. Исчезали

липидные капли и первичные пиносомы. Вытянутые или округлые ядра с глубокими инвагинациями, выступами, кариорексисом и кариолизисом и степень конденсации их гетерохроматина проявляли изменения, сходные с апоптотическими клетками при нанесении ФРН.

Воздействие цисплатина на клетки МБ индуцировало их гибель по типам апоптоза в 95,2 % электроннограмм и некроза — в 4,8 %. Характер гибели опухолевых клеток при обработке данным химиопрепаратом отличался от клеток ПА, где апоптоз наблюдался в 32 % электроннограмм, некроз — в 60 % и смешанный тип — в 8 %. Характерными чертами клеток медуллобластомы, погибших по типу апоптоза, служили снижение площадей ядер и цитолиза, сочетавшееся с повышением степени конденсации гетерохроматина ядра и деградацией ядрышек по сравнению с апоптотическими клетками контроля. Не наблюдали липидных капель. Выявляли возрастание площадей митохондрий и первичных лизосом относительно жизнеспособных и погибших по типам апоптоза и некроза клеток контроля. Отмечали появление вторичных лизосом, что свидетельствовало об интенсивности и глубине протекания лизосомального «переваривания» органелл и цитоплазмы.

Среди особенностей клеток МБ, погибших по типу некроза при воздействии цисплатина, отмечали снижение областей укрупненных липидных капель, уплотнение матрикса округленных митохондрий, что констатировало отсутствие влияний химиопрепарата на окислительное фосфорилирование и синтез АТФ [10]. Аналогично клеткам контроля, погибшим по типам апоптоза и некроза, при некрозе документировали деградацию плазмалеммы, нуклеоплазмы, ядрышек и конденсированного хроматина ядра. Наблюдали повышение области первичных лизосом. Воздействие цисплатина нарушало репликацию и синтез митохондриальной

Рис. 13. Микрофотография клетки МБ, погибшей по смешанному типу при одностороннем воздействии комбинации ФРН ($8,8 \times 10^{-9}$ М) + цисплатин ($3,33 \times 10^{-7}$ М), $\times 7200$

ДНК, на что указывало увеличение диаметров органелл при сохранении их площадей относительно жизнеспособных клеток контроля [10].

Применение комбинации ФРН + цисплатин ($3,33 \times 10^{-7} \text{M}$) индуцировало гибель клеток МБ по типам апоптоза – в 37,5 % электроннограмм, некроза — в 50 % и смешанному типу — в 12 %. Особенности опухолевых клеток, погибших по типу апоптоза при нанесении комбинации ФРН + цисплатин, включали отсутствие первичных лизосом и уменьшение площадей полирибосом относительно культур, погибших по типам апоптоза и некроза при воздействии ФРН. Области вакуолей, цитолизиса и ядер, с характерными глубокими инвагинациями и выпячиваниями, исчезновением митохондрий, липидных капель и малых пиносом, имели сходные значения с наблюдаемыми в апоптотической серии при обработке фактором роста нервов. Степень конденсации ядерного гетерохроматина, лишенного ядрышек, липидные капли и цистерны эндоплазматического ретикулума имели размеры сопоставимые с визуализированными в клетках, погибших по типу апоптоза при воздействии цисплатина.

Отличительным субклеточным признаком клеток медуллобластомы, погибших по типу некроза при обработке комбинацией ФРН + цисплатин, являлось присутствие ядрышек. Констатировали

уменьшение участков микрофиламентов относительно опухолевых клеток, погибших по типу некроза при воздействии ФРН.

К особенности клеток МБ, погибших по смешанному типу при воздействии комбинации ФРН + цисплатин, относилось увеличение площадей ядер по отношению к погибшим по данному типу клеткам контроля и по типам апоптоза, некроза при обработке указанной комбинацией (рис. 13).

Степень конденсации гетерохроматина имела промежуточные значения по сравнению с клетками, погибшими по типам апоптоза и некроза, где он не выявляется. Наблюдали неправильной формы, лишенные кариолеммы ядра с кариорексисом, деградацию ядрышек, митохондрий и липидных капель, как в клетках, погибших по типу апоптоза при воздействии комбинации ФРН + цисплатин. Констатировали увеличение участков мелких лизосом относительно клеток, погибших по смешанному типу при воздействии фактора роста нервов.

Таким образом, введение в комбинацию цисплатина стимулировало активность лизосомального аппарата.

Воздействие темозоломида на клетки МБ индуцировало в 93,7 % клеток на электроннограммах гибель по типу некроза, а в 6,3 % — гибель по смешанному типу (рис. 14). К особенностям клеток

Рис. 14. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу некроза при односуточном воздействии темозоломида ($10,3 \times 0-6 \text{ M}$), $\times 4800$

медуллобластомы, погибших по типу некроза, принадлежали такие как: присутствие плазмалеммы, увеличение площадей округленных, электронно-плотных митохондрий, вакуолей, вторичных пиносом и липидных капель по сравнению с жизнеспособными клетками контроля.

Отмечали снижение показателей ядерно-цитоплазматического соотношения и участков ядер относительно жизнеспособных клеток контроля. Отсутствовали первичные, вторичные лизосомы, ядрышки, области цитолиза и конденсированного хроматина ядра.

К ультраструктурным признакам клеток МБ, погибших по смешанному типу при воздействии темозоломида, относили сокращение площадей ядер по сравнению с некротическими клетками и отсутствие липидных капель. Наблюдалось увеличение вакуолей и первичных лизосом. Аналогично клеткам контроля, погибшим по смешанному типу, констатировали деградацию ядрышек, степень конденсации хроматина составляла 100 %.

Применение комбинации ФРН + темозоломид ($1,03 \times 10^{-7}$ М) вызывало гибель 53,4 % клеток МБ по типу некроза на электроннограммах и 46,6 % – по смешанному типу (рис. 15).

Отличительными признаками ультраструктуры клеток МБ, погибших по типу некроза при обработке комбинацией ФРН + темозоломид, являлись промежуточные величины площадей вакуолей по сравнению с клетками, погибшими по типу некроза при воздействии темозоломида и фактора роста нервов. Отсутствовали первичные, вторичные пиносомы и крупные лизосомы, что указывало на подавление пиноцитоза в клетках опухоли. Наблюдалось уменьшение областей микрофиламентов по отношению к клеткам, погибшим по типам некроза при обработке ФРН. Площади ядер, митохон-

дрий, липидных капель и деградация первичных лизосом, областей цитолиза были аналогичны наблюдаемым в некротических клетках при применении темозоломида.

Среди особенностей клеток медуллобластомы, погибших по смешанному типу при воздействии комбинации ФРН + темозоломид, отмечали снижение участков липидных капель и цитолиза относительно некротических клеток при применении темозоломида. Возрастают области микрофиламентов по сравнению с некротическими клетками при воздействии комбинации ФРН + темозоломид и погибшими по смешанной форме при нанесении ФРН. Отсутствовали митохондрии, которые визуализировали в электроннограммах клеток, погибших по смешанному типу при обработке ФРН и темозоломидом. Области вакуолей, первичных лизосом и исчезновение ядрышек были сходны с таковыми в клетках, погибших по смешанному типу при обработке темозоломидом.

Численность клеток МБ, погибших по разным типам, при воздействии цисплатина, темозоломида, ФРН и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом представлена в таблице 2.

Данные таблицы 2 констатируют, что воздействие цисплатина стимулирует ($p < 0,05$) гибель клеток МБ (до 95,2 %) по типу апоптоза по сравнению с контролем и статистически значимо не влияет на численность клеток, погибших по типу некроза. ФРН статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивает (до 69,3 % и 21,5 %) количество опухолевых клеток, погибших по типам некроза и смешанного соответственно по отношению к контролю, тогда как не влияет на численность клеток, погибших по типу апоптоза. Действие комбинации ФРН + цисплатин на клетки МБ приводит к снижению ($p < 0,05$) количества клеток, погибших по типу апоп-

Рис. 15. Микрофотография клетки МБ, погибшей по типу некроза при однократном воздействии комбинации ФРН ($8,8 \times 10^{-9}$ М) с темозоломидом ($10,3 \times 10^{-7}$ М), $\times 7500$

Таблица 2. Интенсивность спонтанных и индуцированных типов гибели клеток МБ при воздействии химиопрепаратов, ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами

Тип гибели	Процент погибших клеток (абсолютный апоптотический, некротический, смешанного типа индекс), %					
	Серия эксперимента					
	Контроль	Цисплатин	ФРН + цисплатин	Темозоломид	ФРН + темозоломид	ФРН
Апоптоз	9,9 ± 1,9	95,2 ± 1,5 (#√)	37,5 ± 6,3 (†°√)	–	–	9,2 ± 1,4 (#^)
Некроз	7,6 ± 1,3	4,8 ± 0,9 (*)	50,0 ± 8,0 (*†^√)	93,7 ± 2,0 (*^√)	53,4 ± 3,8 (*†°√)	69,3 ± 2,8 (*^√)
Смешанный тип	7,6 ± 1,2	–	12,5 ± 3,5 (*#)	6,3 ± 0,8 (*#)	46,6 ± 4,5 (*†°√)	21,5 ± 2,2 (*#√)

Примечание: знаками † и ° обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия комбинированного от обособленного воздействия химиопрепарата и ФРН соответственно. Символы *, # и ^ указывают на статистически значимые ($p < 0,05$) отличия численности клеток от погибших по типам апоптоза, некроза или смешанного соответственно при обособленном или комбинированном воздействии каждого реагента. Символом √ обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия в численности клеток, погибших по определенному типу гибели при воздействии химиопрепаратов, ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами от гибели клеток по данному типу в контроле.

тоза (до 37,5 %) по сравнению с обособленным воздействием цисплатина, но увеличивает ($p < 0,05$) численность клеток, погибших по данному типу по сравнению с обособленным применением ФРН. Воздействие темозоломида на культуру клеток МБ увеличивает ($p < 0,05$) численность опухолевых клеток, погибших по типу некроза (до 93,7 %) по отношению к контролю. Применение комбинации ФРН + темозоломид снижает ($p < 0,05$) численность клеток, погибших по типу некроза относительно посевов опухоли, обработанных ФРН и темозоломидом.

Выводы

1. Анализ характера ультраструктурных повреждений органелл культур клеток ПА и МБ позволяет установить типы гибели, которые индуцируют цисплатин, темозоломид и ФРН. Применение цисплатина индуцирует гибель клеток ПА и МБ соответственно по типам некроза ($60,0 \pm 1,1$ %) и апоптоза ($95,2 \pm 1,5$ %). Воздействие темозоломида вызывает в $80,0 \pm 6,4$ % клеток ПА и $93,7 \pm 2,0$ % МБ гибель по типу некроза. ФРН стимулирует в клетках ПА гибель по типам некроза ($57,1 \pm 3,3$ %) и апоптоза ($19 \pm 2,6$ %), а в клетках МБ — гибель в результате некроза ($69,3 \pm 2,8$ %) и смешанного типа ($21,5 \pm 2,2$ %).

2. Ультраструктурные изменения, наблюдающиеся в условиях комбинированного применения ФРН с цисплатином, свидетельствуют об увеличе-

нии ($p < 0,05$) численности погибших клеток ПА по типу некроза ($85,8 \pm 1,4$ %) и МБ ($50,0 \pm 8,0$ %) относительно обособленного воздействия ФРН ($57,1 \pm 3,3$ %) и цисплатина ($60,0 \pm 1,1$ %) на клетки ПА и химиопрепарата ($4,8 \pm 0,9$ %) на клетки МБ. При воздействии комбинации ФРН + темозоломид на клетки ПА и МБ наблюдалось усиление ($p < 0,05$) их гибели по смешанному типу ($25,0 \pm 4,8$ % и $46,6 \pm 4,5$ % соответственно) относительно обособленного воздействия на ФРН ($14,5 \pm 1,7$ % и $21,5 \pm 2,2$ %), цисплатина ($8,0 \pm 0,8$ % и 0 %) и темозоломида ($20,0 \pm 6,4$ % и $6,3 \pm 0,8$ %) культуры клеток ПА и МБ.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Pimentel E. Handbook of Growth Factors. Vol. 2. CRC Press. 1994. p. 384.
2. Kalyunov VN. Biology of the Growth Factor of the Nervous Tissue. Minsk: Science and Technology. 1986. p. 208. In Russian [Калюнов В. Н. Биология фактора роста нервной ткани. Минск: Наука и техника. 1986. с. 208].
3. Levi-Montalcini R. The Nerve Growth Factor 35 Years Later. Science. 1987;237(4819):1154–1162.
4. Ohta T, Watanabe T, Katayama Y et al. TrkA Expression is Associated with an Elevated Level of Apoptosis in Classic Medulloblastomas. Neuropathology. 2006;26(3):170–177.

5. Chernov AN. The Cytotoxic Selective Effect of Nerve Growth Factor and Chemotherapy Combinations at Human Neuroepithelial Tumors and Neuroglial Tissue Cell Cultures. Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmatsiya = Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. 2016;(4):157–164. In Russian [Чернов А. Н. Цитотоксическое избирательное действие комбинаций фактора роста нервов с химиопрепаратами на культуры клеток нейроэпителиальных опухолей и нейроглиальной ткани человека. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016;(4):157–164].
6. Kalinichenko SG, Matveyeva NYu. Morphological Characteristics of Apoptosis and Its Significance in Neurogenesis. Morfologiya = Morphology. 2007;131(2):16–28. In Russian [Калиниченко С. Г., Матвеева Н. Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе. Морфология. 2007; 131(2): 16–28].
7. Hansen K, Wagner B, Hamel W et al. Autophagic Cell Death Induced by TrkA Receptor Activation in Human Glioblastoma Cells. J Neurochem. 2007;103(1):259–275.
8. Kroemer G, Levine B. Autophagic Cell Death: The Story of a Misnomer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(12):1004–1010.
9. Li C, Macdonald JI, Hryciw T et al. Nerve Growth Factor Activation of the TrkA Receptor Induces Cell Death, by Macropinocytosis, in Medulloblastoma Daoy cells. J Neurochem. 2010;112(4):882–899.
10. Arismendi-Morillo G. Electron Microscopy Morphology of the Mitochondrial Network in Gliomas and Their Vascular Microenvironment. Biochim Biophys Acta. 2011;1807(6): 602–608.
11. Eyden B. Electron Microscopy in the Diagnosis of Tumours. Curr Diagnostic Pathol. 2002;8(4): 216–224.
12. Navarro R, Reitman AJ, de Leon GA et al. Astroblastoma in Childhood: Pathological and Clinical Analysis. Childs Nerv Syst. 2005;21(3):211–220.
13. Rodriguez FJ, Scheithauer BW. Anaplastic Medulloblastoma with Granular Cell Change. Acta Neuropathol. 2007;113(1):95–99.
14. Yoshimura N, Koyanagi M, Nishi T et al. Cervical Cord Ependymoma with Numerous Microrosettes. Brain Tumor Pathol. 1997;14(2):145–151.
15. Solovev AE, Morgun VV, Malovichko IA et al. Medulloblastomas in Children. Onkopediatriya = Oncopediatrics. 2015;2(2):158–161. In Russian [Соловьёв А. Е., Моргун В. В., Маловичко И. А. и др. Медуллобластомы у детей. Онкопедиатрия. 2015;2(2):158–161].
16. Kokunai T, Iguchi H, Tamaki N. Differentiation and Growth Inhibition of Glioma Cells Induced by Transfer of Trk A Proto-Oncogene. J Neurooncol. 1999;42(1):23–34.
17. Friedrich C, von Bueren AO, von Hoff K et al. Treatment of Adult Nonmetastatic Medulloblastoma Patients According to the Paediatric HIT 2000 Protocol: A Prospective Observational Multicentre Study. Eur J Cancer. 2013;49(4):893–903.
18. Wolff JE, Kortmann RD, Wolff B et al. High Dose Methotrexate for Pediatric High Grade Glioma: Results of the HIT-GBM-D Pilot Study. J Neurooncol. 2011;102(3):433–442.
19. De Vita V. Jr. et al. Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual. Ed. by: E. Chu, V. De Vita, Jr. Moscow: Practice. 2008. p. 447 [В.Де Вита-младший Химиотерапия злокачественных новообразований. Под ред.: Э. Чу, В. Де Вита-младшего. Москва: Практика. 2008. с. 447].
20. Bozhkova VP, Brezhnevsky PD, Buravlev VP et al. Guidance on the Cultivation of Nervous Tissue: Methods. Equipment. Problems. Eds by: Veprintsev B. P., Viktorova I.V., Vilner B.Ya. M: Nauka. 1988. p. 317. In Russian [Божкова В. П., Брежневский П. Д., Буравлев В. П. и др. Руководство по культивированию нервной ткани: Методы. Техника. Проблемы. Под ред.: Б. Н. Веprinцева, И. В. Викторова, Б. Я. Вильнера. М.: Наука. 1988. с. 315]
21. Bogolepov N. N. Methods of Brain Electron Microscopic Examination. M: Nauka. 1976. p. 72. In Russian [Боголепов Н. Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. М: Наука. 1976. с. 72].
22. Belushkina NN, Khomiakova TI, Khomiakov YuN. Cell Death and Specifics of Its Regulation in Tumor Cells. Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova = Sechenov Russian physiological journal. 2009;95(10): 1093–1107. In Russian [Белушкина Н. Н., Хомякова Т. И., Хомяков Ю. Н. Клеточная гибель и особенности ее регуляции в опухолевых клетках. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2009;95(10):1093–1107].
23. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P et al. Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009;16(1):3–11.
24. Nara A, Aki T, Funakoshi T et al. Hyperstimulation of Macropinocytosis Leads to Lysosomal Dysfunction During Exposure to Methamphetamine in SH-SY5Y Cells. Brain Res. 2012;1466:1–14.
25. Krajci D, Mares V, Lisá V et al. Intranuclear Microtubules are Hallmarks of an Unusual Form of Cell Death in Cisplatin-Treated C6 Glioma Cells. Histochem Cell Biol. 2006;125(1–2):183–191.
26. Rodriguez FJ, Scheithauer BW. Anaplastic Medulloblastoma with Granular Cell Change. Acta Neuropathol. 2007;113(1):95–99.

Информация об авторах:

Чернов Александр Николаевич, научный сотрудник отдела микробиологии, клеточных технологий и молекулярной биологии Центра доклинических и трансляционных исследований Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Chernov Aleksandr N., Researcher, Department of microbiology, cell technologies and molecular biology, Center for preclinical and translational research, Institute of experimental medicine of Almazov National Medical Research Centre.