

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616–006:612.6.05:575.113

DOI: 10.17816/pmj37579-89

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

*Т.В. Шамова**, *А.О. Ситковская*, *Э.Е. Росторгуев*, *Н.С. Кузнецова*, *С.Э. Кавицкий*

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, г. Ростов-на-Дону, Россия

PREPARATION OF PRIMARY GLIAL TUMOR CELL LINES

*T.V. Shamova**, *A.O. Sitkovskaya*, *E.E. Rostorguev*, *N.S. Kuznetsova*, *S.E. Kavitsky*

National Medical Research Center for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Цель. Осуществлено исследование, ориентированное на получение первичных клеточных линий злокачественных опухолей головного мозга с использованием метода эксплантатов. Для исследования отобраны 13 мужчин и женщин в возрасте от 22 до 66 лет.

Материалы и методы. Опухолевый материал больных фрагментировали и помещали в культуральную посуду (флаконы) с полной питательной средой для клеток глиальных опухолей. В течение всего периода культивирования проводили фотофиксацию материала, определение морфологии клеток, а также оценку скорости образования монослоя на нулевом и первом пассажах.

Результаты. В результате было получено тринадцать первичных клеточных линий глиальных опухолей человека: шесть линий глиобластомы, две линии глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы, одна линия анапластической олигодендроглиомы, одна линия диффузной астроцитомы, одна линия олигоастроцитомы, одна линия диффузной протоплазматической астроцитомы, одна линия анапластической астроцитомы. В культуре диффузной астроцитомы наблюдали клетки, образующие

© Шамова Т.В., Ситковская А.О., Росторгуев Э.Е., Кузнецова Н.С., Кавицкий С.Э., 2020

тел. +7 863 200 10 00

e-mail: tanyshamova@mail.ru

[Шамова Т.В. (*контактное лицо) – младший научный сотрудник; Ситковская А.О. – научный сотрудник, временно исполняющая обязанности руководителя лаборатории клеточных технологий; Росторгуев Э.Е. – кандидат медицинских наук, заведующий отделением нейроонкологии, врач-нейрохирург; Кузнецова Н.С. – врач-онколог отделения нейроонкологии; Кавицкий С.Э. – кандидат медицинских наук, врач-нейрохирург отделения нейроонкологии].

© Shamova T.V., Sitkovskaya A.O., Rostorguev E.E., Kuznetsova N.S., Kavitsky S.E., 2020

tel. +7 863 200 10 00

e-mail: tanyshamova@mail.ru

[Shamova T.V. (*contact person) – Junior Researcher; Sitkovskaya A.O. – Researcher, Acting Head of Laboratory of Cell Technologies; Rostorguev E.E. – Candidate of Medical Sciences, Head of Department of Neurooncology, neurosurgeon; Kuznetsova N.S. – oncologist, Department of Neurooncology; Kavitsky S.E. – Candidate of Medical Sciences, neurosurgeon, Department of Neurooncology].

сеть на дне флакона. В культуре анапластической астроцитомы при конfluenceности 30–50 % были представлены фибробластоподобные клетки, а при конfluenceности 100 % происходило образование монослоя с интимно прилегающими клетками. В культуре олигоастроцитомы наблюдали как фибробластоподобные клетки, так и островки тесно переплетенных веретеновидных клеток. Подобное было характерно и для клеток диффузной протоплазматической астроцитомы. Анапластическая олигодендроглиома в течение первой недели культивирования была представлена преимущественно округлыми клетками с контрастным веществом, которые впоследствии прикреплялись и активно пролиферировали. При конfluenceности 30–80 % наблюдали фибробластоподобные клетки, а при 100 % – плотно прилегающие друг к другу веретеновидные клетки. Культуры глиобластом были представлены различными морфологическими типами клеток: встречались веретеновидные, фибробластоподобные клетки и клетки с длинными отростками, образующие сеть. Культуры глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы были представлены сетью клеток с длинными отростками.

На нулевом пассаже скорость образования монослоя 100%-ной конfluenceности составляла от 22 до 85 суток. На первом пассаже клетки достигали полного монослоя в пределах от 4 до 25 суток. На нулевом пассаже дольше всех образцов монослоем со 100%-ной конfluenceностью образовывали линии глиобластомы – в среднем 59 суток. Наименьшее время для достижения 100%-ной конfluenceности понадобилось клеткам диффузной астроцитомы, анапластической олигодендроглиомы и глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы – 22–24 суток.

Выводы. В работе показано, что метод эксплантатов обеспечивает получение жизнеспособных клеток глиальных опухолей и возможность их дальнейшего культивирования.

Ключевые слова. Онкология, нейроонкология, опухоли ЦНС, первичные клеточные линии, культивирование клеток человека.

Objective. The aim of this work was to obtain the primary cell lines of brain malignant tumors using the explant method.

Materials and methods. Thirteen patients of both sexes, aged 22 to 66, were recruited. The tumor material of the patients was fragmented and placed in flasks with complete nutrient medium for glial tumor cells. Subsequently, the material was photographed at various stages of cultivation, the cell morphology was determined, and the rate of monolayer formation at the zero and first passages was assessed.

Results. As a result, thirteen primary human cell lines of glial tumors were obtained: six glioblastoma lines, two glioblastoma lines with anaplastic astrocytoma, one anaplastic oligodendroglioma line, one diffuse astrocytoma line, one oligoastrocytoma line and one diffuse protoplasmic astrocytoma line, one anaplastic astrocytoma line. In the culture of diffuse astrocytoma, there were observed the cells forming a network at the bottom of the flask. In the culture of anaplastic astrocytoma at a confluence of 30–50 %, fibroblast-like cells were presented, and at a confluence of 100 %, a monolayer was formed with cells intimately adjacent to each other. In the culture of oligoastrocytoma, both fibroblast-like cells and islets of closely intertwined fusiform cells were observed. The same was typical for the cells of diffuse protoplasmic astrocytoma. Anaplastic oligodendroglioma during the first week of cultivation was represented mainly by round cells with a contrast agent, which subsequently attached and actively proliferated. At a confluence of 30–80 %, fibroblast-like cells were observed, and at 100 %, spindle-shaped cells closely adjacent to each other. In cultures of glioblastomas, no specific character of cell growth was revealed: spindle-shaped, fibroblast-like cells and cells with long processes forming a network were encountered. Glioblastoma cultures against the background of anaplastic astrocytoma were represented by a network of cells with long processes.

At the zero passage, the rate of formation of a 100 % confluence monolayer ranged from 22 to 85 days. At the first passage, the cells reached a full monolayer within 4 to 25 days. At the zero passage, the longest time among all the samples to form the monolayer with a 100 % confluence needed glioblastoma lines – on average 59 days. The shortest time to reach a 100 % confluence was required for cells of diffuse astrocytoma, anaplastic oligodendroglioma and glioblastoma against the background of anaplastic astrocytoma – 22–24 days.

Conclusions. In our work, it was shown that the explant method ensures the production of viable cells of glial tumors and the possibility of their further cultivation.

Keywords. Oncology, neurooncology, CNS tumors, primary cell lines, human cell cultivation.

ВВЕДЕНИЕ

Глиомы являются наиболее распространенными первичными интракраниальными опухолями. Чаще всего встречаются такие типы глиом, как глиобластома, астроцитомы, олигодендроглиома и олигоастроцитомы. Анапластическая астроцитомы и глиобластома в основном поражают лиц в возрасте от 75 до 84 лет, в то время как олигодендроглиома и олигоастроцитомы чаще характерны для людей в возрасте 35–44 лет [1]. Глиобластома представляет собой наиболее распространенную и агрессивную первичную опухоль головного мозга с неблагоприятным прогнозом. Глиобластома является одним из наиболее устойчивых к радиационной терапии и цитотоксической химиотерапии типов опухолей, поэтому остается неизлечимым заболеванием со средней общей выживаемостью 15 месяцев [2, 3]. Известно, что глиобластома является чрезвычайно гетерогенным новообразованием [4]. В связи с этим было разработано множество таргетных фармакологических агентов для улучшения существующих методов лечения. Однако подавляющее большинство этих препаратов не позволило достигнуть долговременной ремиссии не только в клинических испытаниях, но и в испытаниях на животных, что является неутешительным результатом [5].

Постоянные (иммортизированные) клеточные линии являются удобным инструментом в изучении рака, так как они имеют неограниченный потенциал деления, что позволяет получать необходимое для эксперимента количество клеток и стандартизировать получаемые на данных культурах клеток результаты. Однако последние исследования указывают на утрату

гетерогенности опухолевых клеток из-за большого количества пассажей [6]. В связи с этим использование постоянных клеточных линий в качестве инструмента для разработки персонализированного подхода в лечении онкозаболеваний является невозможным. Для решения данной проблемы более подходящим вариантом представляется использование первичных клеточных культур, полученных из нативного опухолевого материала больного [7].

Первичные клеточные культуры гораздо лучше, чем постоянные клеточные линии, отображают свойства опухоли *in vivo*, так как их получают непосредственно из послеоперационного материала [6, 8]. Несмотря на сложности в создании первичных культур и гетерогенность клеток в них, многие исследования показали корреляцию между чувствительностью первичных культур к химиотерапевтическим препаратам и результатами лечения пациентов. Также первичные клеточные культуры успешно используются в разработке индивидуализированного подхода в лечении рака и для тестирования противоопухолевых препаратов [9, 10].

Цель исследования – получение первичных клеточных линий злокачественных опухолей головного мозга с использованием метода эксплантатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для данного исследования было отобрано 13 мужчин и женщин (семь и шесть соответственно) в возрасте от 22 до 66 лет. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, протокол

№ 6/4 от 10 февраля 2020 г. Все пациенты подписывали информированное согласие. У больных были следующие диагнозы: глиобластома, анапластическая олигодендроглиома, диффузная астроцитома, анапластическая астроцитома, олигоастроцитома и диффузная протоплазматическая астроцитома. Пациенты не подвергались никакому виду лечения, кроме хирургического. Первичные клеточные культуры получали из послеоперационного материала, отобранного в ходе удаления опухолей в пределах видимых здоровых тканей с применением нейрофизиологического мониторинга и интраоперационной навигации StealthStation S7.

Для создания первичных культур использовали метод первичных эксплантатов, который заключается в разделении опухолевого образца на небольшие фрагменты равного размера и помещении их в культуральную посуду с полной питательной средой. Данный метод подходит для работы с небольшим количеством ткани, так как повреждение клеточного материала сводится к минимуму [10]. Фрагменты опухолей размером 0,5×0,5 см в условиях операционной помещались в 20 мл стерильного HBSS (Gibco, США) с 1 % пенициллина / стрептомицина («БиоЛот», Россия) и 0,5 % амфотерицина («БиоЛот», Россия). Образцы опухолевой ткани доставляли в стерильный бокс в течение 10 мин. Дальнейшие манипуляции с тканью осуществляли в ламинарном шкафу II класса защиты.

Фрагмент опухоли отмывали в 5 мл стерильного DPBS («БиоЛот», Россия) без содержания ионов магния и кальция и помещали в чашку Петри диаметром 60 мм (Eppendorf, Германия). В чашку Петри добавляли 5 мл чистой питательной среды DMEM

(Gibco, США), образец измельчали стерильными скальпелями (Swann-Morton Ltd., Великобритания). Измельченную ткань вместе со средой с помощью пипетки Пастера переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл (Biofil, Китай) и центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. К осадку добавляли по 5 мл полной питательной среды (ППС) для клеток глиальных опухолей, ресуспендировали. Состав ППС: DMEM (Gibco, США) (с L-глутамином, D-глюкозой и пируватом), 10 % FBS (fetal bovine serum), 1 % пенициллина / стрептомицина, 1 % NEAA (non-essential amino acids), 1 нг/мл FGF (fibroblast growth factor). Весь объем среды с осадком (5 мл) переносили в предварительно подписанные культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см² (T25, Thermo Scientific, США) и инкубировали при 37 °C и 5,5%-ном CO₂.

Раз в 3–5 дней проводили микроскопическое исследование и фотофиксацию клеток во флаконах, а также замену ППС (декантирование отработанной ППС из флакона и добавление свежей). После образования монослоя со 100%-ной конfluence на дне культурального флакона проводили снятие клеток 2,5 мл раствора трипсина (раствор Версена) в соотношении 1:2 в течение 3 мин. Действие трипсина ингибировали внесением питательной среды DMEM с 10 % FBS в объеме 2,5 мл. Весь объем из флакона (5 мл) переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл и осаждали в течение 5 мин при 300 g. Первый пассаж осуществляли также в культуральные флаконы T25.

По достижении монослоем 100%-ной конfluence клетки снимали методом, описанным выше. Далее производили подсчет клеток на автоматическом счетчике клеток EVE (NanoEnTek Inc., Южная Корея) с окрашиванием 0,4%-ным трипановым синим (Nano

EnTek Inc., Южная Корея) в пропорции 1:1. Часть клеточного материала замораживали в криопробирках (Greiner Bio-One International, Германия) в низкотемпературном холодильнике (-80°C) из расчета 1 мл среды для криоконсервации (90 % DMEM и 10 % FBS) на каждые $1 \cdot 10^6$ клеток. Другую часть помещали во флакон с площадью поверхности 75 см^2 (T75, Thermo Scientific, США) в ППС для клеток глиальных опухолей для дальнейшего культивирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании нами было получено тринадцать первичных клеточных линий глиальных опухолей мозга различных гистологических типов: шесть линий глиобластомы, две линии глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы, одна линия олигоастроци-

томы, одна линия диффузной астроцитомы, одна линия анапластической астроцитомы, одна линия анапластической олигодендроглиомы и одна линия диффузной протоплазматической астроцитомы. В табл. 1 представлена информация по полученным нами первичным линиям глиальных опухолей.

Прикрепление эксплантатов ко дну культурального флакона в большинстве случаев осуществлялось в течение суток. Далее наблюдали радиальное расхождение клеток от эксплантата и их прикрепление (рисунок, а). Помимо этого, визуализировали клетки округлой формы с контрастным внутриклеточным веществом, напоминающие вид открепленных от дна культурального флакона адгерентных клеток при переходе в состояние аноиксиса. Однако впоследствии эти клетки прикреплялись и распадались (рисунок, б).

Таблица 1

Характеристика первичных клеточных линий глиальных опухолей

№ п/п	Код образца	Возраст	Пол	Гистологическая верификация	Степень дифференцировки
1	RRIO-GT-01	52	Женский	Диффузная астроцитома, NOS	G2
2	RRIO-GT-02	45	Женский	Анапластическая астроцитома, NOS	G3
3	RRIO-GT-03	60	Мужской	Анапластическая олигодендроглиома	G3
4	RRIO-GT-04	66	Мужской	Глиобластома	G4
5	RRIO-GT-05	64	Женский	Глиобластома, NOS	G4
6	RRIO-GT-06	47	Мужской	Глиобластома, NOS	G4
7	RRIO-GT-07	33	Мужской	Глиобластома, NOS	G4
8	RRIO-GT-08	22	Мужской	Глиобластома на фоне анапластической астроцитомы	G4
9	RRIO-GT-09	46	Женский	Глиобластома на фоне анапластической астроцитомы	G4
10	RRIO-GT-10	38	Женский	Олигоастроцитома, NOS	G2
11	RRIO-GT-11	58	Женский	Глиобластома, NOS	G4
12	RRIO-GT-12	53	Мужской	Глиобластома, NOS	G4
13	RRIO-GT-13	39	Мужской	Диффузная протоплазматическая астроцитома, NOS	G2

Примечание: NOS (not otherwise specified) – без определения генетических альтераций; G (WHO grade) – степень дифференцировки согласно ВОЗ.

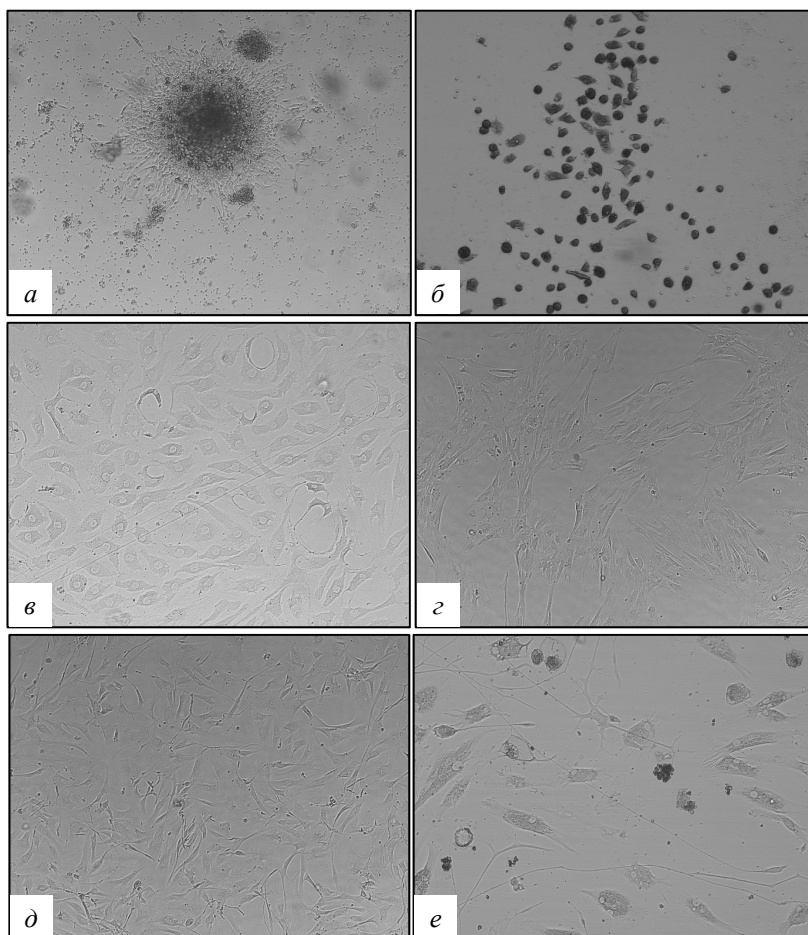


Рис. Фото первичных клеточных линий на разных стадиях культивирования: *а* – глиобластома, эксплантат, клетки только начинают радиально расплываться, 2-е сутки культивирования (ув. $\times 50$); *б* – анапластическая олигодендроглиома, прикрепляющиеся клетки, 13-е сутки культивирования (ув. $\times 50$); *в* – диффузная протоплазматическая астроцитома, конфлюентный монослой из веретеновидных клеток, 66-е сутки культивирования (ув. $\times 100$); *з* – глиобластома, конфлюентный монослой, фибробластоподобные клетки, 103-е сутки культивирования (ув. $\times 50$); *д* – диффузная астроцитома, конфлюентный монослой, 138-е сутки культивирования (ув. $\times 50$); *е* – глиобластома, веретеновидные вакуолизированные клетки, клетки с отростками (ув. $\times 100$)

Морфология клеток глиальных опухолей менялась в ходе культивирования. При монослое со 100%-ной конфлюентностью зачастую наблюдались клетки веретеновидной формы, без отростков, что объясняется их плотным расположением (рисунок, *в*). При конфлюентности от 10 до 90 % можно было визуализировать клетки с большим ко-

личеством длинных отростков (рисунок, *д, е*) и фибробластоподобные клетки (рисунок, *з*).

В ходе культивирования диффузной астроцитомы в основном наблюдали клетки, образующие сеть на дне флакона. В культуре анапластической астроцитомы при конфлюентности 30–50 % были представлены фибробластоподобные клетки, а при конфлю-

ентности 100 % происходило образование монослоя с интимно прилегающими клетками. В культуре олигоастроцитомы одновременно наблюдался как фибробластоподобный характер роста клеток, так и островки тесно переплетенных веретеновидных клеток. Подобное было характерно и для клеток диффузной протоплазматической астроцитомы.

Анапластическая олигодендроглиома в течение первой недели культивирования была представлена преимущественно округлыми клетками с контрастным веществом, которые впоследствии прикреплялись и активно пролиферировали (см. рисунок, б). При конfluenceности 30–80 % наблюдали фибробластоподобные клетки, а при 100 % – плотно прилегающие друг к другу веретеновидные клетки.

Культуры глиобластом были представлены различными морфологическими типами клеток: встречались веретеновидные, фибробластоподобные клетки и клетки с длинными отростками, образующие сеть. Вероятно, различия в морфологии клеток связаны с гетерогенностью данного типа опухоли [4]. Обе культуры глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы были представлены сетью клеток с длинными отростками, однако в одной из них в ходе культивирования на первом пассаже при конfluenceности менее 80 % наблюдались клетки полигональной формы с многочисленными короткими отростками, при этом нарастание клеточной конfluenceности свыше 80 % демонстрировало изменение характера роста на фибробластоподобный.

В нашей работе на нулевом пассаже скорость образования монослоя 100%-ной конfluenceности варьировалась от 22 до 85 суток (табл. 2). При этом на первом пас-

саже клетки достигали полного монослоя быстрее – в пределах от 4 до 25 суток, что демонстрирует увеличение скорости пролиферации клеток в 3–4 раза при переходе с нулевого на первый пассаж и, следовательно, свидетельствует об эффективности применяемых условий культивирования клеток из материала глиальных опухолей. Последнее имеет особое значение при создании банка первичных клеточных линий для дальнейшего скрининга противоопухолевых терапевтических агентов. Среди образцов глиобластомы была отмечена тенденция к более активной пролиферации клеток на первом пассаже в сравнении с другими глиальными опухолями. При этом в линиях глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы скорость образования монослоя в сравнении с образцами первичной глиобластомы была в 2–4 раза меньше. Однако для статистического подтверждения данной тенденции необходимо увеличение выборки.

На нулевом пассаже дольше всех образцов монослоем со 100%-ной конfluenceностью образовывали линии глиобластомы – в среднем 59 суток. Наименьшее время для достижения 100%-ной конfluenceности понадобилось клеткам, полученным из диффузной астроцитомы, анапластической олигодендроглиомы и глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы – 22–24 суток.

Большинство существующих систем культивирования клеток были разработаны для фибробластов, эпителиальных клеток и клеток крови. В связи с этим культивирование клеток мозга, включая глиобластомы, сталкивается с проблемами подбора приемлемых условий культуральной среды. В то время как фибробласты, эпителиальные клетки и клетки крови контактируют с сывороткой,

Скорость образования монослоя первичных клеточных линий глиальных опухолей на нулевом и первом пассажах

№ п/п	Название клеточной линии	Гистологическая верификация	Время образования 100%-ного конфлюентного монослоя на нулевом пассаже, сут	Время образования 100%-ного конфлюентного монослоя на первом пассаже, сут
1	RRIO-GT-01	Диффузная астроцитома, NOS, (GIII)	23	4
2	RRIO-GT-02	Анапластическая астроцитома, NOS, (GIII)	38	6
3	RRIO-GT-03	Анапластическая олигодендроглиома, (GIII)	24	7
4	RRIO-GT-04	Глиобластома, (GIV)	55	23
5	RRIO-GT-05	Глиобластома, NOS, (GIV)	42	5
6	RRIO-GT-06	Глиобластома, NOS, (GIV)	40	5
7	RRIO-GT-07	Глиобластома, NOS, (GIV)	70	5
8	RRIO-GT-08	Глиобластома на фоне анапластической астроцитомы, (GIV)	22	25
9	RRIO-GT-09	Глиобластома на фоне анапластической астроцитомы, (GIV)	23	14
10	RRIO-GT-10	Олигоастроцитома, NOS, (GI)	53	5
11	RRIO-GT-11	Глиобластома, NOS, (GIV)	85	5
12	RRIO-GT-12	Глиобластома, NOS, (GIV)	64	5
13	RRIO-GT-13	Диффузная протоплазматическая астроцитома, NOS (GI)	50	7

Примечание: NOS (not otherwise specified) – без определения генетических альтераций; G (WHO grade) – степень дифференцировки согласно ВОЗ.

клетки головного мозга контактируют со спинномозговой жидкостью, которая имеет особый белковый состав, поскольку многие белки сыворотки не могут преодолевать гематоэнцефалический барьер [11]. Хотя большинство белков спинномозговой жидкости происходит из крови, около 20 % из них берут начало из мозга [12]. Базальные питательные среды, такие как DMEM и DMEM/F12, были разработаны для того, чтобы способствовать быстрому делению соматических клеток, и поэтому не были приспособлены для постмитотических клеток, таких как нейроны. В данной работе мы не ставили столь сложных задач, как выращивание нейронов, однако для культивирова-

ния клеток глиальных опухолей также необходим подбор определенных суплементов, обеспечивающих их жизнеспособность и митоз *in vitro*.

Добавление факторов роста, как и выбор питательной среды, также имеет основополагающее значение для поддержания клеточного метаболизма и специализированных функций клеток. В работе Ledur и др. (2017) был проведен метаанализ публикаций по созданию первичных клеточных линий глиобластом, проиндексированных в базе данных Web of Science с 2012 по 2017 г., где было показано, что в исследованиях глиобластом все еще широко применяется сыворотка – почти в половине работ – в то время

как в другой половине были использованы факторы роста EGF/FGF-2 [7]. Вероятно, сыворотка как богатый источник питательных веществ потенциально может охватывать большее разнообразие типов клеток, в сравнении с питательной средой, содержащей один или два изолированных фактора роста. Наиболее часто используемым условием для дифференцировки клеточной линии была среда с добавлением 10 % FBS, в то время как для предотвращения дальнейшей дифференцировки условием была среда без сыворотки, обычно с добавлением FGF-2 и EGF. Однако концентрация факторов роста сильно варьировалась в различных статьях, поэтому стандартного подхода на данный момент не существует.

В работе Piaskowski et al. (2011) было отмечено, что некоторые типы глиом трудно поддерживать *in vitro* даже при культивировании в присутствии сыворотки, например, мутантные глиомы IDH1 [13].

Выводы

В результате исследования в лаборатории клеточных технологий совместно с отделением нейроонкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России было получено тринадцать первичных клеточных линий рака мозга человека: четыре типа астроцитомы, шесть глиобластом, две глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы и анапластическая олигодендроглиома. По результатам оценки морфологии клеток первичных клеточных линий и скорости образования монослоя со 100%-ной конфлюентностью на нулевом и первом пассажах было показано, что метод эксплантатов

обеспечивает получение жизнеспособных клеток глиальных опухолей и возможность их дальнейшего культивирования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J.B., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenbauer E., Mirimanoff R.O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987–996.
2. Cloughesy T.F., Cavenee W.K., Mischel P.S. Glioblastoma. From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2014; 9: 1–25.
3. DeAngelis L.M. Global consequences of malignant CNS tumours: a call to action. *The Lancet Neurology* 2019; 4: 324–325.
4. Patel A.P., Tirosh I., Trombetta J.J., Shalek A.K., Gillespie S.M., Wakimoto H., Cabill D.P., Nabel B.V., Curry W.T., Martuza R.L., Louis D.N., Rozenblatt-Rosen O., Suva M.L., Regev A., Bernstein B.E. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014; 344: 1396–1401.
5. Polivka J., Holubec L., Kubikova T., Priban V., Hes O., Pivovarcikova K., Treskova I. Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Res* 2017; 37: 21–33.
6. Cree I.A., Glaysber S., Harvey A.L. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 4: 375–379.
7. Ledur P.F., Onzi G.R., Zong H., Lenz G. Culture conditions defining glioblastoma cells

behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget* 2017; 40: 69185–69197.

8. Межевова И.В., Ситковская А.О., Кум О.И. Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания *in vitro*. Южно-российский онкологический журнал 2020; 3: 36–49.

9. Gorelik B., Ziv I., Shohat R., Wick M., Hankins W.D., Sidransky D., Agur Z. Efficacy of Weekly Docetaxel and Bevacizumab in Mesenchymal Chondrosarcoma: A New Theranostic Method Combining Xenografted Biopsies with a Mathematical Model. *Cancer Res* 2008; 21: 9033–9040.

10. Freshney R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition. New Jersey: Wiley-Blackwell 2010; 732.

11. Foo L.C., Allen N.J., Bushong E.A., Ventura P.B., Chung W.S., Zhou L., Cahoy J.D., Daneman R., Zong H., Ellisman M.H., Barres B.A. Development of a Method for the Purification and Culture of Rodent Astrocytes. *Neuron*. 2011; 71: 799–811.

12. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001; 310: 173–186.

13. Piaskowski S., Bienkowski M., Stoczynska-Fidelus E., Stawski R., Sieruta M., Szybka M., Papierz W., Wolanczyk M., Jaskolski D.J., Liberski P.P., Rieske P. Glioma cells showing IDH1 mutation cannot be propagated in standard cell culture conditions. *Br J Cancer* 2011; 104: 968–970.

REFERENCES

1. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J.B., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T.,

Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenbauer E., Mirimanoff R.O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987–996.

2. Cloughesy T.F., Cavenee W.K., Mischel P.S. Glioblastoma. From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2014; 9: 1–25.

3. DeAngelis L.M. Global consequences of malignant CNS tumours: a call to action. *The Lancet Neurology* 2019; 4: 324–325.

4. Patel A.P., Tirosh I., Trombetta J.J., Shalek A.K., Gillespie S.M., Wakimoto H., Cabill D.P., Nabeed B.V., Curry W.T., Martuza R.L., Louis D.N., Rozenblatt-Rosen O., Suva M.L., Regev A., Bernstein B.E. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014; 344:1396–1401.

5. Polivka J., Holubec L., Kubikova T., Priban V., Hes O., Pivovarcikova K., Treskova I. Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Res* 2017; 37: 21–33.

6. Ledur P.F., Onzi G.R., Zong H., Lenz G. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget* 2017; 40: 69185–69197.

7. Cree I.A., Glaysher S., Harvey A.L. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 4: 375–379.

8. Mezhevoва И.В., Ситковская А.О., Кит О.И. Primary Tumor Cell Cultures: Current Methods of Obtaining and Subcultivation. *South Russian Journal of Cancer* 2020; 3: 36–49 (in Russian).

9. Gorelik B., Ziv I., Shohat R., Wick M., Hankins W.D., Sidransky D., Agur Z. Efficacy of Weekly Docetaxel and Bevacizumab in Mesenchymal Chondrosarcoma: A New Theranostic Method Combining Xenografted

Biopsies with a Mathematical Model. *Cancer Res* 2008; 21: 9033–9040.

10. *Freshney R.I.* Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition. New Jersey: Wiley-Blackwell 2010; 732.

11. *Foo L.C., Allen N.J., Bushong E.A., Ventura P.B., Chung W.S., Zhou L., Caboy J.D., Daneman R., Zong H., Ellisman M.H., Barres B.A.* Development of a Method for the Purification and Culture of Rodent Astrocytes. *Neuron* 2011; 71: 799–811.

12. *Reiber H.* Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001; 310: 173–186.

13. *Piaskowski S., Bienkowski M., Stoczynska-Fidelus E., Stawski R., Sieruta M., Szybka M., Papierz W., Wolanczyk M., Jaskolski D.J., Liberski P.P., Rieske P.* Glioma cells showing IDH1 mutation cannot be propagated in standard cell culture conditions. *Br J Cancer* 2011; 104: 968–970.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Материал поступил в редакцию 12.07.2020