

МЕТОДИКА ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕТАСТАЗИРУЮЩЕЙ КРЫСИНОЙ ГЛИОМЫ C6 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ

ПАШИНСКАЯ Е.С., СЕМЕНОВ В.М., ПОБЯРЖИН В.В., КУБРАКОВ К.М.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск,
Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2020. – Том 19, №3. – С. 23-29.

THE REPRODUCTION TECHNIQUE OF EXPERIMENTAL METASTATIC RAT GLIOMA C6 WITH THE USE OF A FLUORESCENT DYE

PASHINSKAYA E.S., SEMENOV V.M., PABIARZHYN V.V., KUBRAKOV K.M.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2020;19(3):23-29.

Резюме.

Цель – разработать методику воспроизведения экспериментальной метастазирующей крысиной глиомы C6 с использованием флюоресцентного красителя.

Опыт проводили на 10 самках крыс линии Wistar. Реализация цели достигалась за счет того, что культуру опухолевых клеток C6 суспензировали в питательной среде, затем к полученной суспензии добавляли флюоресцентный краситель CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye и помещали в инкубатор. После инкубирования суспензии опухолевых клеток C6 с флюоресцентным красителем CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye, ее доставали и отмывали три раза. Образовавшуюся суспензию окрашенных живых опухолевых клеток в концентрации 10×10^9 вводили подкожно в надключичную область. Затем животному ставили внутримышечную инъекцию метпрезона в течение 10 дней. Через 3 месяца на месте введения культуры окрашенных опухолевых клеток C6 фиксировали новообразование. Новообразование и внутренние органы крысы забирали для проведения оценки миграции окрашенных опухолевых клеток C6 с целью подтверждения процесса метастазирования с помощью конфокального микроскопа. Из биоптатов опухоли и органов готовили препараты для иммуногистохимического подтверждения глиомной специфичности путем определения маркеров GFAP, S-100.

Ключевые слова: глиома, метастазирование, флюоресцентный краситель, крыса.

Abstract.

The aim of this study is to develop a technique for reproducing experimental metastatic rat glioma C6 using a fluorescent dye.

The experiment was performed on 10 female Wistar rats. The goal was achieved by suspending a culture of C6 tumor cells in a culture medium, then adding a fluorescent CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye to the resulting suspension and placing it in an incubator. After incubating the C6 tumor cell suspension with CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye, it was removed and washed three times. The resulting suspension of colored living tumor cells in a concentration of 10×10^9 was injected subcutaneously into the supraclavicular region. The animal was then given an intramuscular injection of metpresone during 10 days. After 3 months at the site of introduction of colored tumor cells C6 culture neoplasm was fixed. The neoplasm and internal organs of the rat were taken to assess the migration of colored C6 tumor cells in order to confirm the metastasis process using a confocal microscope. Preparations from organ biopsies were prepared for immunohistochemical confirmation of gliomic specificity by determining GFAP and S-100 markers.

Key words: glioma, metastasis, fluorescent dye, rat.

Известно, что новообразования различного генеза возникают в процессе хаотичного деления клеток, сопровождающегося атипичным тканевым ростом с образованием опухолей [1-3]. Причиной такого процесса является воздействие факторов различного генеза [4, 5].

Показано, что в гетерологичных (злокачественных) опухолях нарушена органотипическая, гистотипическая и цитотипическая дифференцировка, что сопровождается их инфильтрирующим и быстрым ростом. Характеристикой злокачественных опухолей также является способность к метастазированию и рецидивированию. В процессе метастазирования атипичные клетки мигрируют по кровеносным и лимфатическим сосудам, серозным оболочкам и образуют метастазы. В метастазах опухоль чаще всего имеет аналогичное строение, что и основной узел. В них возникают некроз, кровоизлияние, а размеры могут превышать «материнскую» опухоль [6, 7].

Среди пациентов с онкологией злокачественные опухоли головного мозга составляют весомую долю. Глиальные опухоли встречаются в 20,8% случаев у мужчин и 13,6% у женщин. Наиболее часто среди глиом диагностируются опухоли больших полушарий мозга (70,4% случаев) [9]. «Излюбленная» локализация полушарных глиом – лобная доля (8,6%), височная доля (12,8%) и теменная доля (8,6%) [9-12].

Для разработки новых методов изучения механизмов канцерогенных процессов, контроля над процессом метастазирования и регрессии, подбора грамотных терапевтических подходов биологам и медикам необходимо иметь высоко воспроизводимые опухолевые модели. Одной из таких является крысиная глиома С6. На данный момент существует несколько доступных способов воспроизведения крысиной глиомы [13-16]. Но в них описано только локальное развитие опухоли *in situ*. Кроме того, считают, что именно для этой экспериментальной глиомы процесс метастазирования не характерен.

Цель работы – разработать методику воспроизведения экспериментальной метастазирующей крысиной глиомы С6 с использованием флуоресцентного красителя.

Материал и методы

В эксперименте использовали 10 самок крыс линии Wistar массой 180-200 г, которые до начала манипуляций проходили двухнедельный

карантин. Работа с животными осуществлялась в соответствии с требованиями биомедицинской этики.

Для воспроизведения экспериментальной метастазирующей глиомы с использованием флуоресцентного красителя культуру опухолевых клеток С6 суспензировали в питательной среде DMEM из расчета 10×10^9 опухолевых клеток в 1 мл среды при комнатной температуре. Затем к полученной суспензии добавляли 5 мкл флуоресцентного красителя CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye из расчета на 1 мл клеточной суспензии опухолевых клеток С6 и перемешивали. Выбор красителя обоснован тем, что этот флуоресцентный краситель живых клеток выдерживает фиксацию метанолом и пермеабиллизацию, позволяет быстро окрашивать плазматические мембраны, совместить окрашивание плазматических мембран с внутриклеточным окрашиванием с помощью антител. Выбранный краситель является аминореактивным веществом, аккумулирующимся в клеточной мембране. Окрашивание обладает высокой стабильностью, низкой токсичностью, краситель не переносится между клетками, что делает его пригодным для длительных исследований по маркировке и отслеживанию клеток.

Далее суспензию опухолевых клеток С6 помещали в инкубатор при температуре 37°C на 30 минут. После инкубирования суспензии опухолевых клеток С6 с флуоресцентным красителем CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye, ее отмывали путем центрифугирования при 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут при температуре 37°C. Образовавшуюся надосадочную жидкость удаляли и повторяли процесс отмывки по схеме 3 раза. После последней отмывки надосадочную жидкость удаляли и проводили определение жизнеспособности культуры клеток С6 с применением трипанового синего. Для этого суспензию окрашенных опухолевых клеток С6 смешивали с 0,5% раствором трипанового синего в соотношении 1:1 и выполняли подсчет количества неокрашенных (жизнеспособных) клеток с помощью камеры Горяева [17]. Затем рассчитывали дозу введения окрашенной культуры клеток С6 в концентрации 10×10^9 клеток на крысу линии Wistar массой 180-200 граммов.

Затем готовили инъекцию метпрезона, используя порошок для приготовления раствора для инъекций (40 мг) из расчета 0,001 мл на 1 грамм веса животного.

Крысу, которой проводили инъекцию окра-

шенной культуры живых опухолевых клеток С6, фиксировали вручную. Голову крысы отводили в сторону, надключичную область освобождали от шерсти, смазывали дезинфицирующим раствором. С соблюдением правил асептики суспензию окрашенных живых опухолевых клеток в концентрации 10×10^9 вводили подкожно. Место инъекции плотно зажимали ватным тампоном, смоченным в дезсредстве, и удерживали.

Затем животному ставили внутримышечную предварительно подготовленную инъекцию метпрезона. Место прокола зажимали ватным тампоном, смоченным в дезсредстве, и удерживали.

Инъекции метпрезона проводили ежедневно в течение 10 дней после введения культуры окрашенных опухолевых клеток С6.

Через три месяца крысу умерщвляли под эфирным наркозом. На месте инъекции культуры окрашенных опухолевых клеток С6 фиксировали новообразование, которое забирали для получения гистологических срезов с помощью замораживающего микротомы [18].

Затем проводили остальную часть вскрытия крысы для забора таких органов, как головной мозг, легкие, печень, селезенка. Гистологические срезы изготавливали с помощью замораживающего микротомы [18].

Оценку миграции окрашенных опухолевых клеток С6 для подтверждения процесса метастазирования (визуализация контуров окрашенных клеток) в гистологических препаратах проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа «Leica TCS SPE» (Leica-microsystems, Германия), используя при этом аргонный лазер для возбуждения флуоресценции в красной и зеленой областях спектра [19]. Место скопления опухолевых клеток (метастаз) выявляли с помощью лазера путем возбуждения флуоресценции с границами диапазона детекции 360–420 нм. Обработку информации осуществляли в программе LAS AF.

Подтверждение развития высокозлокачественной глиомы и ее метастазирования проводили иммуногистохимическим методом путем определения основных специфических глиомных маркеров GFAP, S-100 [4] в забранном материале системой визуализации 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System (with DAB Solution, Wuhan Elabscience Biotechnology Incorporated Company, Китай, E-IR-R213).

Подсчет окрашенных клеток проводили с использованием светового микроскопа Leica DM

2500 в непересекающихся полях зрения в 1000 клетках каждого среза. Характеристику экспрессии и оценку доли окрашенных клеток (Immune reactivity, IRS) давали по инструкции по применению «Иммуногистохимические методы исследования новообразований различного генеза» [18].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10 с применением критерия Манна–Уитни и считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Через 3 месяца после введения окрашенных опухолевых клеток глиомы С6 нами выявлено, что опухоли развились в месте инъекции. По форме опухоли овальной формы, размер 2–3 см³, размещены в капсуле с хорошо развитой кровеносно-сосудистой системой. При разрезе новообразования были плотной, упругой консистенции, красного цвета (рис. 1, 2).

Гистологическая оценка показала: в срезах опухоли обнаружены полиморфные округлые клетки со слабобазофильным ядром и фигурами митозов. Межклеточное вещество было представлено нейропилем (рис. 3, 4). Гистологическое заключение: глиобластома (глиома).

Иммуногистохимический анализ выявил, что в биоптатах опухоли экспрессия GFAP составила 2+ (37,46%; 95% ДИ : 29,38–38,45; IRS=4), а S 100 - 1+ (15,63%; 95 % ДИ : 13,35–17,44; IRS=5).

Макроскопическое изучение остальных органов показало: легкие и печень увеличены в размерах, имеют спайки. На поверхности органов визуализируются множественные новообразования, выступающие за границы органов, размером от 0,3 до 1 см³. Зафиксированные нами новообразования были плотной консистенции, серо-розового цвета, округлой формы, наполнены жидкостью (рис. 5, 6).

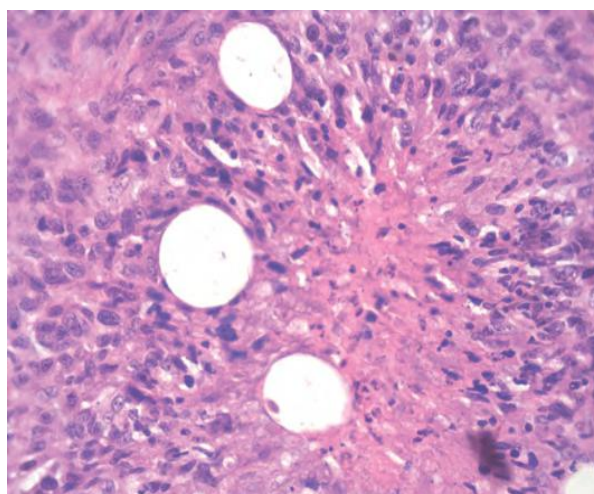
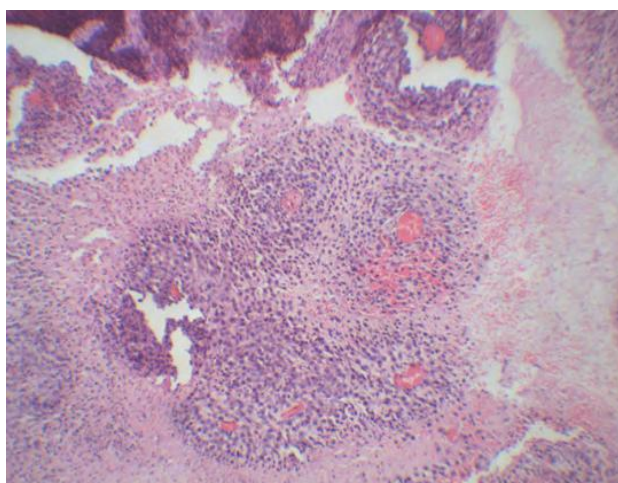
При оценке препаратов иммуногистохимическим методом нами выявлено, что в биоптатах легких экспрессия GFAP составила 1+(17,66%; 95% ДИ : 16,55–18,13; IRS=4), S 100 - 1+(14,56%; 95 % ДИ : 12,57–15,43; IRS=5). В срезах печени GFAP - 1+ (19,24%; 95 % ДИ : 17,10–20,44; IRS=5); S 100 - 1+(13,82%; 95% ДИ : 12,78–14,11; IRS=5).

Макроскопический осмотр селезенки показал, что она увеличена, зернистой структуры, цвет не изменен. Новообразований обнаружено не было.

В свою очередь, головной мозг животных был стандартных размеров, оболочки тонкие, на



Рисунки 1, 2 – Крысиная глиома С6 через 3 месяца после введения окрашенных опухолевых клеток.



Рисунки 3, 4 – Очаги некроза и кровоизлияния в опухолевой ткани, окруженные палисандром опухолевых клеток и кровеносными сосудами, окраска гематоксилин-эозином, x100, x400.

поверхности встречались темные вкрапления, напоминающие кровоизлияния. Плотность вещества мозга была обычная. При фронтальном разрезе мозга отчетливо выделялось серое и белое вещество. Желудочки мозга были без расширений.

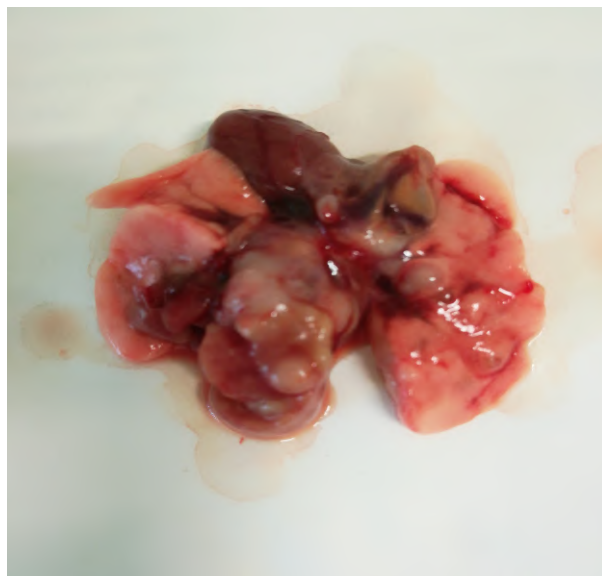
По результатам иммуногистохимического анализа экспрессии специфических маркеров GFAP и S 100 изменений в селезенке и головном мозге нами не выявлено.

В свою очередь, в препаратах биоптатов опухолей, легких и печени с помощью конфокальной микроскопии выявлены скопления светящихся окрашенных клеток (островки), которые располагались не организованно, беспорядочно и неравномерно, имели разную форму и интенсивность свечения. Островки клеток были разобщены между собой (рис. 7-9), а максимальный

уровень свечения в них окрашенных клеток был отмечен нами в срезах опухоли и легких.

Обсуждение

В настоящий момент биологическое моделирование опухолей головного мозга является востребованным [13-15, 20]. Ученые предлагают различные варианты получения опухолей, максимально приближенных к человеческим [16, 17, 20]. Известно, что глиобластомы развиваются *de novo* и характеризуются высокой скоростью роста, с преимущественной локализацией в полушариях головного мозга. Опухоль, имеющая астроцитарное происхождение, обладает диффузным ростом и может глубоко внедриться в здоровую ткань [9, 10, 21]. Однако в подавля-



Рисунки 5, 6 – Множественные новообразования, выступающие за границы легких и печени.

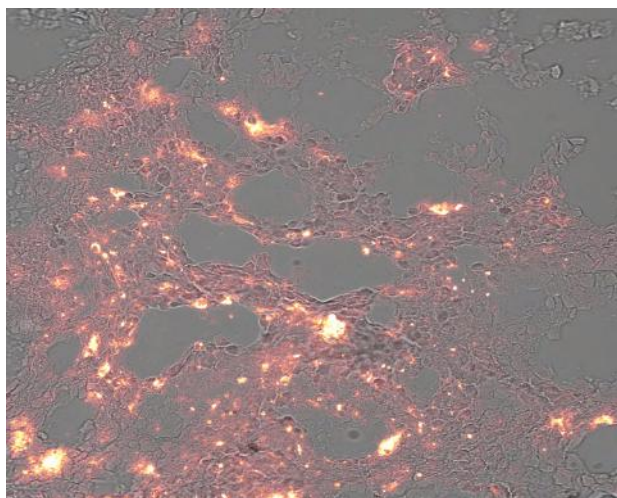


Рисунок 7 – Скопления светящихся окрашенных клеток в опухолевой ткани глиомы.



Рисунок 8 – Скопления светящихся окрашенных клеток в опухолевой ткани легких.

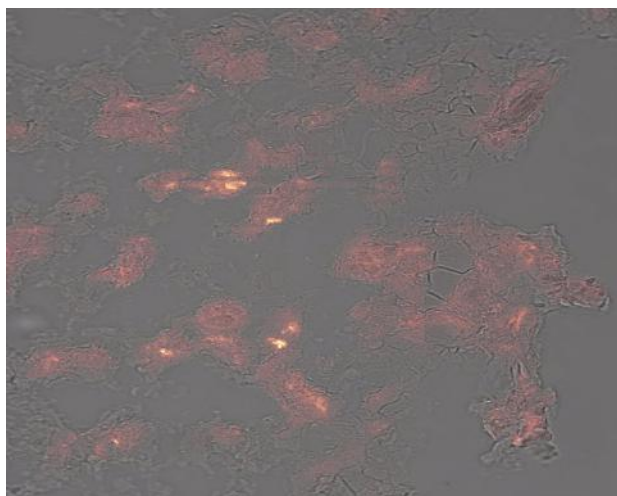


Рисунок 9 – Скопления светящихся окрашенных клеток в опухолевой ткани печени.

ющем большинстве случаев эта опухоль растет медленно, инфильтративно, границу опухоли и здоровых тканей не всегда удастся найти даже при помощи микроскопа [9, 10, 21]. Процесс метастазирования глиобластом чаще всего остается неподтвержденным.

Представленная авторами модель не имеет аналогов на данный момент и прототипов и является воспроизводимой, экономически доступной.

Заключение

Разработанная нами модель воспроизведения экспериментальной метастазирующей крысиной глиомы С6 с использованием флюо-

ресцентного красителя может быть применена для проведения доклинических исследований на животных, разработки инновационных методов изучения молекулярно-генетических механизмов прогрессирования злокачественных глиальных новообразований и установления важных закономерностей их метастазирования с точки зрения общебиологического процесса. С помощью этой модели могут быть разработаны принципиально новые подходы к диагностике и клеточной терапии глиом высокой степени злокачественности.

Литература

- Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing / M. Imielinski [et al.] // *Cell*. – 2012 Sep. – Vol. 150, N 6. – P. 1107–1120.
- Intracerebral metastasis of glioblastoma multiforme. Case report and literature review / D. Jezewski [et al.] // *Ann. Acad. Med. Stetin*. – 2011. – Vol. 57, N 1. P. 59–63.
- Clinical and molecular characteristics of NF1-mutant lung cancer / A. J. Redig [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2016 Jul. – Vol. 22, N 13. – P. 3148–3156.
- Global cancer statistics / A. Jemal [et al.] // *CA. Cancer J. Clin.* – 2011 Mar-Apr. – Vol. 61, N 2. – P. 69–90.
- Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network / A. Caye [et al.] // *Nat. Genet.* – 2015 Nov. – Vol. 47, N 11. – P. 1334–1340.
- Jankowska, M. Sexual functioning in young women in the context of breast cancer treatment / M. Jankowska // *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* – 2013 May. – Vol. 18, N 4. – P. 193–200.
- Морфологические и физиологические особенности раковых клеток у млекопитающих / В. В. Поляриж [и др.] // *Вестн. ВГМУ*. – 2016. – Т. 15, № 6. – С. 28–40.
- Генные механизмы возникновения раковых опухолей / В. М. Семенов [и др.] // *Здравоохранение*. – 2017. – № 7. – С. 38–47.
- Колотов, К. А. Иммуногистохимические особенности глиальных опухолей головного мозга / К. А. Колотов, О. В. Машковцев, Б. Н. Бейн // *Мед. альм.* – 2012. – № 4. – С. 66–69.
- Корниенко, В. Н. Опухоли головного мозга / В. Н. Корниенко // *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН*. – 2004. – Т. 15, № 1/2. – С. 23–30.
- Albesiano, E. Mechanisms of local immunoresistance in glioma / E. Albesiano, J. E. Han, M. Lim // *Neurosurg. Clin. N. Am.* – 2010 Jan. – Vol. 21, N 1. – P. 17–29.
- Altaner, C. Glioblastoma and stem cells / C. Altaner // *Neoplasma*. – 2008. – Vol. 55, N 5. – P. 369–374.
- Халанский, А. С. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. I. Биологическая характеристика / А. С. Халанский, Л. И. Кондакова // *Клин. и эксперим. морфология*. – 2013. – № 4. – С. 63–68.
- Халанский, А. С. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8. II. Использование в качестве модели для экспериментальной терапии опухолей мозга / А. С. Халанский, Л. И. Кондакова, С. Э. Гельперина // *Клин. и эксперим. морфология*. – 2014. – № 1. – С. 50–59.
- Barth, R. F. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas / R. F. Barth, B. Kaur // *J. Neurooncol.* – 2009 Sep. – Vol. 94, N 3. – P. 299–312.
- Способ соно-фотодинамической терапии перевитой подковожно глиомы C6 у крысы : пат. 19417 Респ. Беларусь МПК A61N 5/067, A61N 7/00 / Истомин Ю. П., Александрова Е. Н., Чалов В. Н., Церковский Д. А. ; заявитель и патентообладатель Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии им. Н. Н. Александрова. – № a20120970 ; заявл. 27.06.12 ; опубл. 28.02.14, Афиц. бюл. № 4.
- Черкасова, Е. И. Работа с культурами клеток : учеб.-метод. пособие / Е. И. Черкасова, А. А. Брилкина. – Нижний Новгород : Изд-во Нижегород. ун-та, 2015. – 57 с.
- Иммуногистохимические методы исследования новообразований различного генеза : инструкция по применению № 160-1110 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.02.2011 г. / Э. А. Надыров [и др.]. – Гомель, 2011. – 20 с.
- Сайфитдинова, А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов : учеб.-метод. пособие / А. Ф. Сайфитдинова. – Санкт-Петербург : Соло, 2008. – 68 с.
- Экспериментальные модели мультиформной глиобластомы человека / Т. И. Хомякова [и др.] // *Клин. и эксперим. морфология*. – 2015. – № 1. – С. 60–69.
- Метастазы глиобластом: ретроспективный анализ серии из шести клинических наблюдений / С. А. Горайнов [и др.] // *Вопр. нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко*. – 2015. – Т. 79, № 2. – С. 33–43.
- doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2377
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107
- Caye A, Strullu M, Guidez F, Cassinat B, Gazal S, Fenneteau O, et al. Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network. *Nat Genet.* 2015 Nov;47(11):1334-40. doi: 10.1038/ng.3420
- Jankowska M. Sexual functioning in young women in the context of breast cancer treatment. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2013 May;18(4):193-200. doi: 10.1016/j.rpor.2013.04.032

Поступила 01.04.2020 г.

Принята в печать 01.06.2020 г.

References

- Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*. 2012 Sep;150(6):1107-20. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.029
- Jezewski D, Parafiniuk D, Nowacki P, Kojder I. Intracerebral metastasis of glioblastoma multiforme. Case report and literature review. *Ann Acad Med Stetin*. 2011;57(1):59-63.
- Redig AJ, Capelletti M, Dahlberg SE, Sholl LM, Mach S, Fontes C, et al. Clinical and molecular characteristics of NF1-mutant lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 Jul;22(13):3148-
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107
- Caye A, Strullu M, Guidez F, Cassinat B, Gazal S, Fenneteau O, et al. Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network. *Nat Genet.* 2015 Nov;47(11):1334-40. doi: 10.1038/ng.3420
- Jankowska M. Sexual functioning in young women in the context of breast cancer treatment. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2013 May;18(4):193-200. doi: 10.1016/j.rpor.2013.04.032

7. Pashinskaya ES, Semenov VM, Dmitrachenko TI, Shlyakhtunov EA. Morphological and physiological characteristics of cancer cells in mammals. *Vestn VGMU*. 2016;15(6):28-40. (In Russ.)
8. Semenov VM, Pashinskaya ES, Pobyarzhin VV, Subbotina IA, Shlyakhtunov EA. Gene mechanisms of cancer. *Zdravookhranenie*. 2017;(7):38-47. (In Russ.)
9. Kolotov KA, Mashkovtsev OV, Beyn BN. Immunohistochemical features of glial brain tumors. *Med AI'm*. 2012;(4):66-9. (In Russ.)
10. Kornienko VN. Brain tumors. *Vestn RONTs im NN Blokhina RAMN*. 2004;15(1-2):23-30. (In Russ.)
11. Albesiano E, Han JE, Lim M. Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurg Clin N Am*. 2010 Jan;21(1):17-29. doi: 10.1016/j.nec.2009.08.008
12. Altaner C. Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma*. 2008;55(5):369-74.
13. Khalanskiy AS, Kondakova LI. Transplantable strain of rat glioma 101.8. I. Biological Characterization. *Klin Eksperim Morfologiya*. 2013;(4):63-8. (In Russ.)
14. Khalanskiy AS, Kondakova LI, Gel'perina SE. Transplantable strain of rat glioma 101.8. II. Use as a model for experimental treatment of brain tumors. *Klin Eksperim Morfologiya*. 2014;(1):50-9. (In Russ.)
15. Barth RF, Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol*. 2009 Sep;94(3):299-312. doi: 10.1007/s11060-009-9875-7
16. Istomin YuP, Aleksandrova EN, Chalov VN, Tserkovskiy DA; zaiavitel' i patentoobladatel' Resp nauch-prakt tsentr onkologii i med radiologii im NN Aleksandrova. Method for sono-photodynamic therapy of rats subcutaneously implanted glioma C6 in rat: pat 19417 Resp Belarus' MPK A61N 5/067, A61N 7/00. № a20120970; zaiavl 27.06.12; opubl 28.02.14, Afits Biul № 4. (In Russ.)
17. Cherkasova EI, Brilkina AA. Work with cell cultures: ucheb-metod posobie. Nizhny Novgorod, RF: Izd-vo Nizhegorod un-ta; 2015. 57 p. (In Russ.)
18. Nadyrov EA, Rogov YuI, Dubrovskiy ACh, Voropaev EV, Achinovich SL, Krylov AYU, i dr. Immunohistochemical methods for the study of neoplasms of various genesis: instruktسيا po primeneniui № 160-1110: utv M-vom zdravookhraneniia Resp Belarus' 11.02.2011 g. Gomel', RB; 2011. 20 p. (In Russ.)
19. Saifitdinova AF. Two-dimensional fluorescence microscopy for the analysis of biological samples: ucheb-metod posobie. Saint Petersburg, RF: Solo; 2008. 68 p. (In Russ.)
20. Khomyakova TI, Makarova OV, Khalanskiy AS, Fedoseeva VV, Mikhaylova LP, Khomyakov YuN. Experimental models of human glioblastoma multiforme. *Klin Eksperim Morfologiya*. 2015;(1):60-9. (In Russ.)
21. Goryaynov SA, Potapov AA, Ignatenko MA, Zhukov VYu, Protskiy SV, Zakharova NA, i dr. Glioblastoma metastases: a retrospective analysis of a series of six clinical observations. *Vopr Neirokhirurgii im NN Burdenko*. 2015;79(2):33-43. (In Russ.)

Submitted 01.04.2020

Accepted 01.06.2020

Сведения об авторах:

Пашинская Е.С. – к.б.н., доцент, докторант кафедры инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
 Семенов В.М. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
 Побыржин В.В. – к.б.н., доцент, декан факультета подготовки иностранных граждан, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;
 Кубраков К.М. – к.м.н., доцент кафедры неврологии и нейрохирургии, докторант кафедры инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Pashinskaya E.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, doctoral candidate of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Semenov V.M. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.
Pobyarzhyn V.V. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, dean of the Overseas Students Training Faculty, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;
Kubakov K.M. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Neurology & Neurosurgery, doctoral candidate of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК.
 E-mail: paschinskaya.cat@yandex.ru – Пашинская Екатерина Сергеевна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining. E-mail: paschinskaya.cat@yandex.ru – Ekaterina S. Pashinskaya.