

УДК 616-006.484.03, 616-006.484.04, 577.29

Сравнительный анализ эффективности связывания бактериофагов, экспонирующих опухольадресующие пептиды, с опухолевыми и здоровыми клетками мозга

© 2020 М.А. ДЫМОВА^{1*}, А.А. ВОЙТОВА¹, М.Д. ДМИТРИЕВА¹, В.А. РИХТЕР¹,
Е.В. КУЛИГИНА¹

¹ ФБГУН «Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины» СО РАН, Новосибирск, 630090

*e-mail: maya.a.rot@gmail.com

Поступила в редакцию 24.08.2020 г.

После доработки 18.09.2020 г.

Принята к публикации 15.11.2020 г.

Методами проточной цитометрии и иммуноферментного анализа проведена сравнительная оценка эффективности связывания бактериофагов, экспонирующих опухольадресующие пептиды, полученных с помощью технологии фагового дисплея к клеткам глиобластомы человека U-87 MG, с клетками U-87 MG и клетками мозга эмбриона человека ДКМ-5. Методом флуоресцентной микроскопии показано специфическое связывание отобранных бактериофагов с клетками U-87 MG. На основании полученных данных для дальнейших исследований с целью создания таргетных противоопухолевых соединений выбраны бактериофаги, экспонирующие опухольадресующие пептиды, обеспечивающие наиболее эффективное связывание фаговой частицы с клетками U-87 MG

Ключевые слова: фаговый дисплей, опухольадресующие пептиды, глиобластома, проточная цитометрия, иммуноферментный анализ.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-61-67

Опухоли головного мозга являются одними из самых трудноизлечимых типов злокачественных новообразований [1]. Несмотря на прогресс в области диагностики и лечения онкологических заболеваний в целом, выживаемость пациентов с глиобластомой не изменяется. Таким образом, разработка новых подходов к лечению, в частности, таргетных лекарственных средств, остается актуальной задачей. Повышение специфичности как уже имеющихся, так и вновь создаваемых противоопухолевых лекарственных средств может быть обеспечено за счет использования коротких пептидов в качестве адресующих агентов. Такие пептиды обладают высокими коэффициентами проникновения в опухоль, низкой иммуногенностью, высокой аффинностью к мишени и относительной стабильностью [2]. Одним из эффективных

способов получения опухольадресующих пептидов является скрининг комбинаторных фаговых пептидных библиотек, который проводят как в системе *in vitro* на культурах раковых клеток, так и *in vivo* моделях опухолей. Ранее в нашей лаборатории с помощью технологии фагового дисплея были отобраны опухольадресующие пептиды к клеткам мультиформной глиобластомы человека U-87 MG [3]. Целью данной работы являлось сравнение специфичности связывания бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды, с клетками глиобластомы человека U-87 MG и здоровыми клетками мозга эмбриона человека ДКМ-5. Опухольадресующие пептиды, обладающие наибольшей эффективностью, могут быть в дальнейшем использованы в качестве адресующих агентов для доставки терапевтических генов, цитокинов,

Список сокращений: АБТС — 2,2'-Азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфокислота), ВОЗ — Всемирная Организация Здравоохранения, ИФА — иммуноферментный анализ, α МЕМ — α -модификация среды Игла, FBS — фетальная бычья сыворотка, БСА — бычий сывороточный альбумин, БОЕ — Бляшкообразующие единицы, DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндола, ФЭУ — фотоэлектронные умножители, FSC — прямое рассеяние, SSC — боковое светорассеяние, APC — Аллофикоцианин.

агентов для визуализации, проапоптотических пептидов и цитотоксических препаратов в опухолевые клетки.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Культивирование клеток эукариот

Клетки мультиформной глиобластомы человека U-87 MG (Коллекция клеточных культур ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск), а также диплоидные клетки мозга эмбриона человека ДКМ-5 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Новосибирск) культивировали в среде α MEM в присутствии 10%-ной FBS, 2 mM L-глутамин, 250 мг/мл амфотерицина В и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина. Клетки всех культур выращивали в культуральных флаконах при температуре $37,0 \pm 1,0$ °C в атмосфере $5,0 \pm 0,5\%$ CO₂.

Анализ эффективности связывания опухолеадресующих бактериофагов с клетками методом проточной цитофлуориметрии

Клетки U-87 MG, достигшие 80–90% конфлюэнтности, обрабатывали 10 mM ЭДТА/PBS pH 8,0 для открепления. Клетки промывали PBS и инкубировали в течение 2 ч при 37 °C в ростовой среде. Далее клетки промывали буфером А (1%-ным FBS/PBS) и инкубировали 30 мин на льду с опухолеадресующими бактериофагами (10^{10} БОЕ/мл) в PBS-БСА Ca/Mg буфере (0,1% БСА, 1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂·6H₂O/PBS). Клетки промывали 1%-ным FBS/PBS и инкубировали на льду с 10%-ным FBS/PBS 15 мин, затем с антителами мыши к белку рVIII фага M13 (ab9225, Abcam, Великобритания), разведенными в буфере А (1:200), 30 мин. Клетки промывали буфером А и инкубировали 30 мин на льду с вторичными антителами к иммуноглобулину G мыши (donkey anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 647, ThermoFisher, США), также разведенными в буфере А (1:200). Клетки промывали, ресуспендировали в 500 мкл этого же буфера и использовали для анализа на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (Beckman Coulter Inc., США).

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, инкубированных с опухолеадресующими бактериофагами

Клетки U-87 MG инкубировали на стеклах BD Falcon culture slides, (Beckman Coulter Inc.) до 80–90% конфлюэнтности, затем промывали два раза PBS и добавляли опухолеадресующие бактериофаги ($2 \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл) в PBS-БСА Ca/Mg буфере. Клетки инкубировали с бактериофагом 2 ч

при 37 °C, с последующей обработкой по ранее описанной методике с небольшими модификациями [4]. Клетки промывали три раза буфером (100 mM глицин, 0,5 M NaCl, pH 2,5) комнатной температуры, фиксировали холодным 4%-ным формальдегидом в течение 10 мин и промывали два раза PBS. Затем к фиксированным клеткам добавляли 0,2% Тритона X100, выдерживали 10 мин, дважды промывали PBS, затем инкубировали при 4 °C в течение 45 мин с мышинными анти-M13 моноклональными антителами, разведенными в 1%-ном БСА/PBS буфере (1:200). Четырежды промывали холодным 1%-ным БСА/PBS буфером, затем инкубировали при 4 °C в течение 45 мин с вторичными антителами к иммуноглобулину G мыши (donkey anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 647 Abcam, разведенными в 1%-ном БСА/PBS буфере (1:200). Клетки промывали четыре раза холодным 1% БСА/PBS буфером, затем ядра клеток окрашивали DAPI и анализировали с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Анализ эффективности связывания опухолеадресующих бактериофагов с клетками U-87 MG и со здоровыми клетками мозга человека методом иммуноферментного анализа

Клетки U-87 MG и ДКМ-5 рассаживали в 96-луночные планшеты в количестве 10^5 клеток на лунку и инкубировали сут в полной ростовой среде. Затем ростовую среду удаляли, клетки промывали 200 мкл PBS и фиксировали 10%-ным забуференным формалином (06-001/S, «Биовитрум», Россия) в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего промывали 3 раза 200 мкл PBS. Опухольадресующие бактериофаги разводили в 1% БСА/PBS из расчета 10^{10} БОЕ на лунку и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Контрольные клетки инкубировали в тех же условиях. Далее в каждую лунку добавляли по 200 мкл 1%-ного БСА/PBS, содержащего 10^{10} БОЕ тестируемого бактериофага. Каждый бактериофаг анализировали в трех повторях. Клетки инкубировали 2 ч при 37 °C, отмывали 5 раз свежеприготовленным промывочным буфером (0,05% Твин 20/PBS). Моноклональный пероксидазный конъюгат HRP/anti-M13 (арт. 27-9421-01, GE Healthcare, США) разводили в соотношении 1:5000 в свежеприготовленном блокирующем буфере (2% БСА/PBS), добавляли по 200 мкл на лунку и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После инкубации промывали 6 раз промывочным буфером. Далее готовили

Бактериофаги, экспонирующие пептиды, специфически взаимодействующие с клетками и опухолью U-87 MG глиобластомы человека

The bacteriophages displaying tumor-targeting peptides, selectively binding with cells and tumor U-87 MG

№ бактериофага	Пептидная библиотека	Система скрининга	Аминокислотная последовательность пептида.	Частота встречаемости, %
19	Ph.D — 7	<i>in vitro</i>	NHTTPRH	68,5
20	Ph.D — 7	<i>in vitro</i>	NHTTPRH	68,5
26	Ph.D — 12	<i>in vitro</i>	SWTFGVQFALQH	24,3
36	Ph.D — 12	<i>in vitro</i>	SWTFGVQFALQH	24,3
49	Ph.D — 7	<i>in vitro</i>	EQAYQYS	9,2
83	Ph.D — 7	<i>in vivo</i>	PVSNKMS	22,2
92	Ph.D — 7	<i>in vivo</i>	HPSSGSA	25,9

раствор АБТС (2,2'-Азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфокислота) диаммониевой соли из расчета: 0,22 мг АБТС в 1 мл 0,05 М лимонной кислоты pH 4,0. Непосредственно перед использованием добавляли 1,71 мкл 30%-ной H₂O₂ на 1 мл раствора АБТС, перемешивали и вносили по 200 мкл в лунку. Инкубировали 20–60 мин при комнатной температуре до появления зеленого окрашивания. Для измерения оптической плотности раствора использовали планшетный спектрофотометр Apollo-8 LB 912 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Германия) спектр поглощения определяли при длине волны 405–415 нм.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием двухвыборочно-го критерия Стьюдента и программы «GraphPad Prism» (GraphPad Software, США). Критический уровень значимости принимался равным 1%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами с помощью скрининга фаговых пептидных библиотек Ph.D-7 и Ph.D-12 (New England Biolabs, США) были отобраны бактериофаги (№№ 19, 20, 26, 36, 49, 83, 92), экспонирующие опухольадресующие пептиды, которые обеспечивают специфическое связывание фаговых частиц с клетками глиобластомы человека U-87 MG *in vitro* и опухолью U-87MG в модели ксенографтов. Последовательности опухольадресующих пептидов, частоты встречаемости бактериофагов при скрининге и системы скрининга представлены в табл. 1. Было показано, что бактериофаги №№ 26, 83, 92 специфически связываются с клетками первичных культур глиом человека различной степени злокачественности, и экспонируемые этими бактериофагами

опухольадресующие пептиды могут быть использованы для адресной доставки как диагностических (пептиды 26, 83 и 92), так и терапевтических (пептиды 83 и 92) молекул к клеткам опухолей головного мозга человека [3].

В данной работе мы провели сравнительную оценку эффективности связывания бактериофагов, экспонирующих опухольадресующие пептиды, отобранные к клеткам глиобластомы человека U-87 MG, с клетками U-87 MG и здоровыми клетками мозга эмбриона человека ДКМ-5. Также был проведен сравнительный анализ *in silico* аминокислотных последовательностей отобранных опухольадресующих пептидов с последовательностями пептидов и белков, имеющихся в доступных базах данных.

Связывание бактериофагов, экспонирующих опухольадресующие пептиды, полученных путем селекции *in vitro* и *in vivo*, с клетками глиобластомы человека U-87 MG оценивали методом проточной цитометрии. Визуализацию бактериофагов, связавшихся с клетками U-87 MG, проводили с помощью системы первичных и вторичных антител. Параметры напряжения ФЭУ по каналам составляли: FSC — 175, SSC — 430, APC — 410. Распределение клеток в зависимости от величины флуоресцентного сигнала по каналу APC приведены на рис. 1.

Анализ гистограмм показал, что процент окрашенных клеток, а значит процент бактериофагов, связавшихся с клетками U-87 MG, уменьшается в ряду: № 26 (32%)> № 20 (30,5%)> № 49 (29,6%)> № 36 (29,5%)> № 19 (25,6%)> NEB (отрицательный контроль, бактериофаг без вставки) (16,3%)> sec АВ (клетки U-87 MG, инкубированные с вторичными антителами) (7,3%)> № 92 (2,7%)> № 83 (2,2%). Таким образом, согласно данным цитометрии бактериофаги №№ 26, 20, 49, 36 и 19 являются наиболее перспективными для дальнейшего исследования.

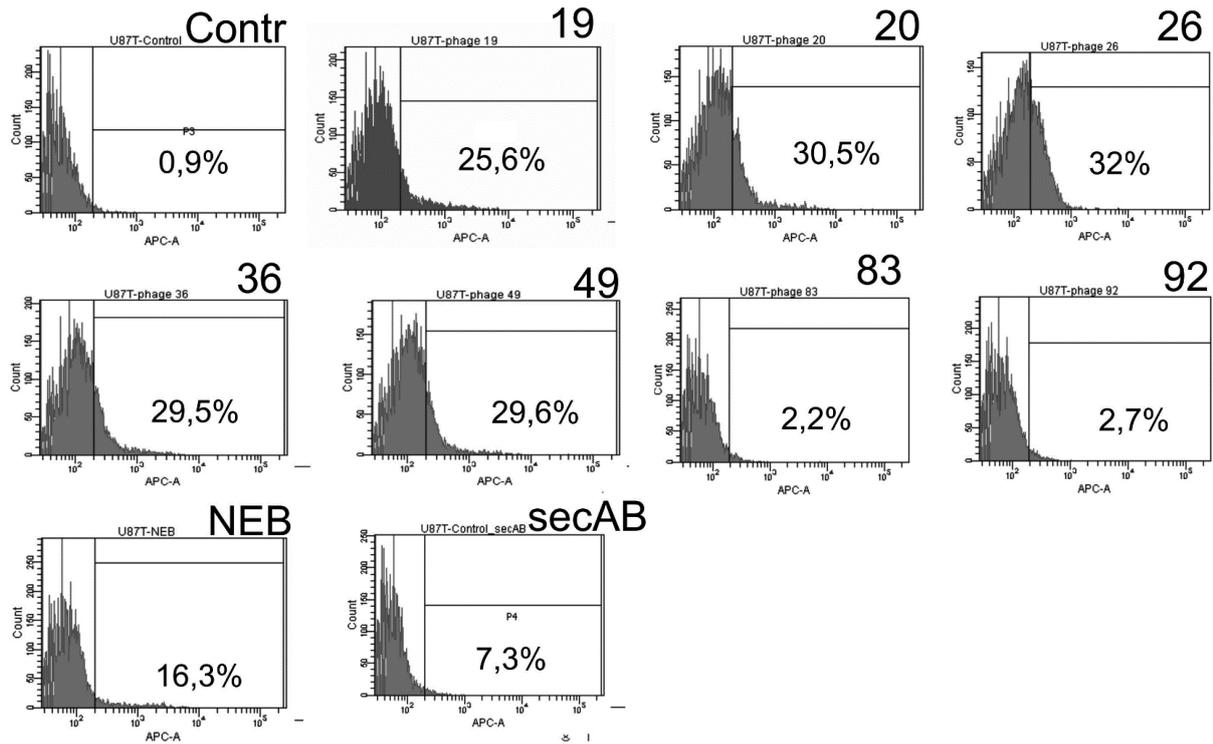


Рис. 1. Определение эффективности связывания бактериофагов, экспонирующих полученные опухолядресующие пептиды, и контрольного бактериофага с клетками глиобластомы человека U-87MG. Методом проточной цитофлуориметрии.

sec AB — клетки U-87 MG, инкубированные с вторичными антителами; NEB — контрольный бактериофаг (бактериофаг без вставки)

Ось ординат — число клеток, ось абсцисс — интенсивность флуоресценции, отн.ед. Внутри гистограммы обозначены номера бактериофагов и процент окрашенных клеток.

Fig. 1. Binding of U-87MG cells to bacteriophages exhibiting the resulting tumor-addressing peptides and a control bacteriophage by flow cytometry. sec AB — U-87 MG cells incubated with secondary antibodies; NEB — control bacteriophage (bacteriophage without insertion).

The ordinate axis is the number of cells, the abscissa axis is the fluorescence intensity, rel. Inside the histogram, bacteriophage numbers and the percentage of stained cells are indicated.

Анализ эффективности связывания бактериофагов, экспонирующих опухолядресующие пептиды, с клетками глиобластомы человека U-87 MG и здоровыми клетками мозга человека ДКМ-5 был проведен с помощью ИФА с использованием моноклонального пероксидазного конъюгата HRP/Anti-M13. Данный метод позволяет качественно и полуколичественно оценить эффективность связывания бактериофагов, экспонирующих отобранные опухолядресующие пептиды, с клетками. Культуру здоровых клеток мозга человека ДКМ-5 использовали при проведении ИФА в качестве отрицательного контроля. Результаты спектрофотометрического анализа представлены на рис. 2.

Статистический анализ полученных данных показал специфическое связывание с клетками U-87 MG бактериофагов № № 19, 20, 26, 36, 49 [p-value<0,0001], № 92 [p-value=0,0002] и № 83 [p-value=0,0004] и отсутствие связывания с клетками бактериофага без

вставки NEB [p-value=0,0593]. Наиболее эффективно с клетками U-87 MG связывался бактериофаг № 26, экспонирующий пептид SWTFGVQFALQH. Стоит отметить, что результаты ИФА коррелируют с результатами цитометрии — бактериофаг № 26 наиболее эффективно связывался с клетками U-87 MG (процент клеток U-87 MG, выявляемых антителами к бактериофагу M13, был наибольшим).

Статистический анализ показал отсутствие селективного связывания с клетками мозга эмбриона человека ДКМ-5 как бактериофагов, экспонирующих отобранные опухолядресующие пептиды № 19 [p-value=0,1586], № 20 [p-value=0,5545], № 26 [p-value=0,5545], № 36 [p-value=0,2932], № 49 [p-value=0,1281], № 83 [p-value=0,0854], № 92 [p-value=0,4275], так и бактериофага без вставки NEB [p-value=0,4706].

Анализ эффективности связывания бактериофагов, экспонирующих опухолядресующие пептиды, с клетками глиобластомы человека

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

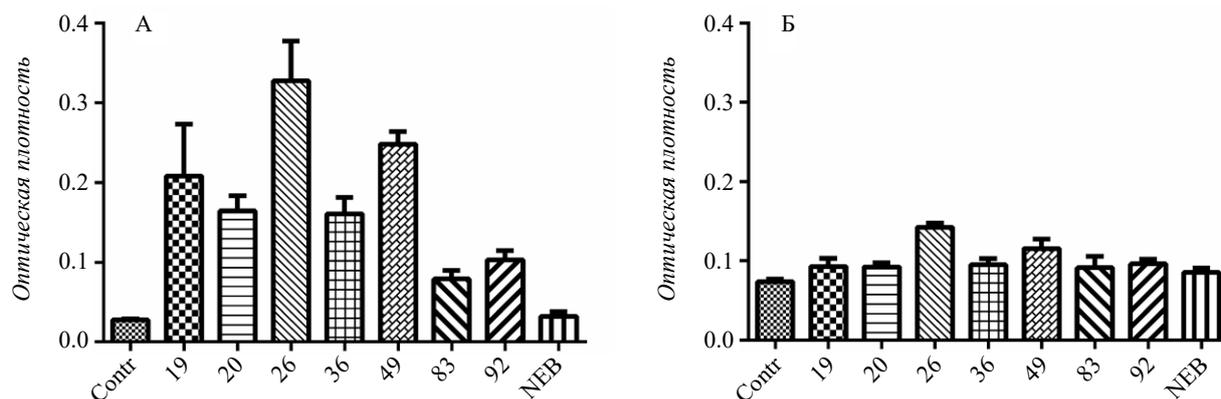


Рис. 2. Относительное связывание бактериофагов, экспонирующих опухольадресующие пептиды, с клетками U-87 MG (a) и клетками мозга эмбриона человека ДКМ-5 (b). По оси абсцисс: Contr — клетки без анализита, NEB — бактериофаг без вставки, номерами обозначены тестируемые бактериофаги. По оси ординат — оптическая плотность. Длина волны 405–415 нм.

Fig. 2. Relative binding of bacteriophages displaying tumor-specific peptides to U-87 MG cells (a) and brain cells of human embryo DKM-5 (b). On the abscissa: Contr — cells without analyte, NEB — bacteriophage without insertion, numbers indicate the tested bacteriophages. The ordinate axis is the optical density. The wavelength is 405–415 nm.

U-87 MG оценивали методом флуоресцентной микроскопии (рис. 3). Ранее мы показали, что пептид, экспонируемый бактериофагом № 26, обеспечивает связывание и интернализацию фаговой частицы в клетки астроцитомы AS2, но не в клетки глиобластомы MG1 человека [3], поэтому на рис. 3 представлена флуоресцентная микроскопия клеток, инкубированных с бактериофагами № № 19, 20, 36, 49. Существенных различий в эффективности связывания с клетками бактериофагов, экспонирующих исследуемые пептиды, обнаружено не было. Таким образом, полученные опухольадресующие пептиды способны обеспечить эффективное специфическое связывание фаговых частиц с клетками глиобластомы U-87 MG

Одной из задач данного исследования было проведение сравнительного анализа *in silico* аминокислотных последовательностей отобранных опухольадресующих пептидов с последовательностями пептидов и белков, уже имеющихся в доступных базах данных. Мы использовали базу данных PepBank, которая основана на поиске гомологии аминокислотной последовательности пептида с уже имеющимися в общедоступных источниках данных [5]. Только для двух пептидов была найдена гомология с уже известными пептидами. Так, для пептида NHTTPRH (бактериофаги № № 19, 20) найденная гомология с предшественником антигена CAMPATH-1 или CD52 составила 83%. Антиген CAMPATH-1 является пептидом, состоящим из 12 аминокислот, который связан с гликозилфосфатидилинозитолом [6]. Предполагают, что основная функция данного пептида анти-адгезивная, что приводит к ослаблению адгезии экспрессирующих его

клеток, и, соответственно, уменьшает их способность к метастазированию. Было показано, что лиганд APRIL (A Proliferation Inducing Ligand), относящийся к суперсемейству рецептора фактора некроза опухолей и коэкспрессирующийся с CD52, ассоциирован с высокой степенью злокачественности глиом [7]. Для пептида HPSSGSA (бактериофаг № 92) была найдена 83% гомология с пептидом RYHPQSGS, имеющим устойчивый к протеолитической деградации в организме мотив HPQ/M [8, 9]. Для остальных пептидов гомологию *in silico* обнаружить не удалось.

В дальнейшем мы планируем экспериментальные работы по поиску клеточных мишеней для наиболее перспективных опухольадресующих пептидов, хотя и не исключаем возможности того, что взаимодействие пептида с поверхностью клетки носит конформационный характер. Другим ограничением данного подхода является гетерогенность глиом, что потребует получения адресных пептидов для каждого типа опухоли.

Таким образом, на основании данных ИФА, проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии для дальнейших исследований выбраны бактериофаги № № 19, 20, 26, 36, 49, экспонирующие опухольадресующие пептиды, обеспечивающие наиболее эффективное связывание фаговых частиц с клетками U-87 MG. По результатам дальнейших экспериментов *in vivo* на опухоли глиобластомы человека U-87 MG, трансплантированной иммунодефицитным животным, будут выбраны наиболее перспективные опухольадресующие пептиды для конъюгирования с ингибиторами Pak1 киназы и создания таргетных противоопухолевых соединений.

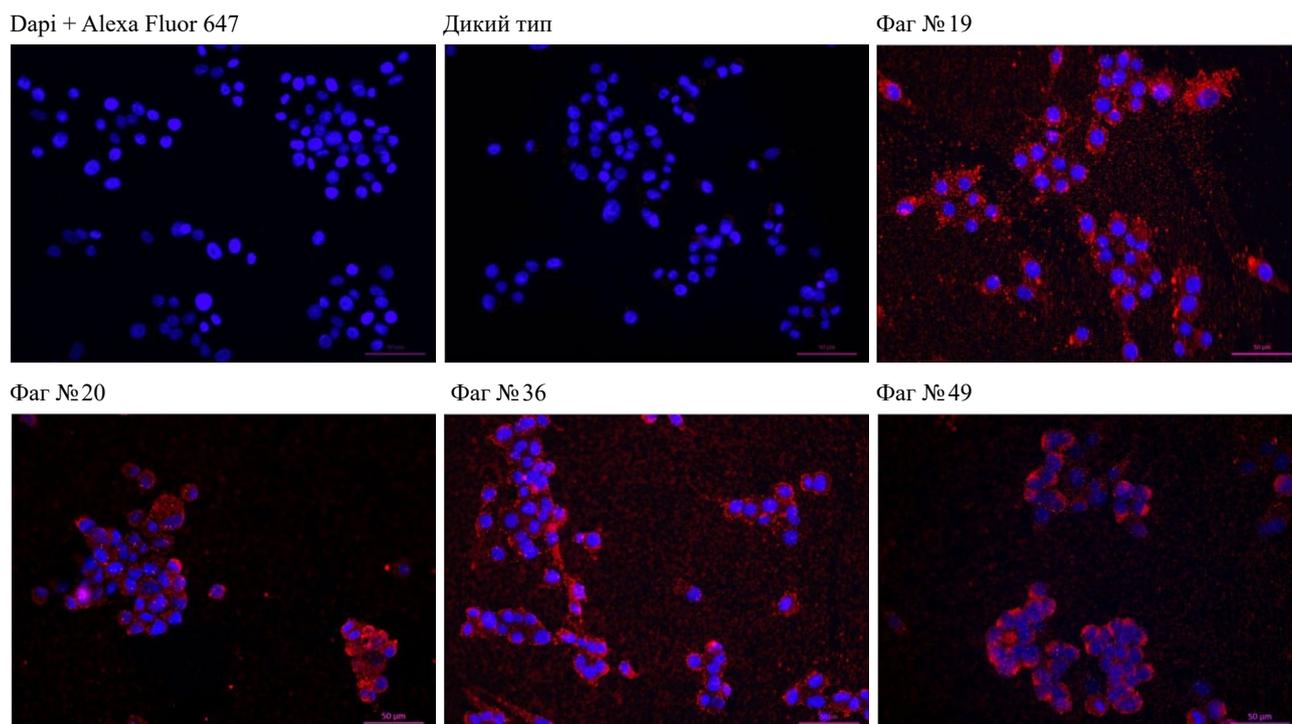


Рис. 3. Клетки глиобластомы человека U-87 MG, инкубированные с исследуемыми бактериофагами. Флуоресцентная микроскопия. Первичные антитела — антитела мыши к белку pVIII фага M13 (ab9225, Abcam); вторичные антитела (donkey anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 647, ThermoFisher). Ядра клеток окрашивали DAPI.

Fig. 3. Human glioblastoma cells U-87 MG incubated with the tested phages. Fluorescence microscopy. Primary antibodies — anti-M13 antibodies (ab9225, Abcam); secondary antibodies — donkey anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 647, ThermoFisher. The cells were stained with DAPI for visualization of the nuclei.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность руководителю ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН Байбородину С.И. за помощь в проведении конфокальной микроскопии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (Грант № 19-44-02006).

ЛИТЕРАТУРА

1. Komori T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurol. Med. Chir.*, 2017, 57, 301–311. doi: 10.2176/nmc.ra.2017-0010
2. Wu D. et al. Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.*, 2014, 351(1), 13–22. doi: 10.1016/j.canlet.2014.05.002
3. Voitova A.A. et al. Tumor Specific Peptides Selected for Targeted Delivery of Therapeutic Agents to Glioma Human Cells. *Russ. J. Bioorganic. Chem.*, 2019, 45(6), 783–792. doi: 10.1134/S1068162019060384
4. Rasmussen U.B. et al. Tumor cell-targeting by phage-displayed peptides. *Cancer Gene Ther.*, 2002, 9(7), 606–612. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700476>
5. Shtatland T. et al. PepBank - A database of peptides based on sequence text mining and public peptide data sources. *BMC Bioinformatics. BioMed Central*, 2007, 8, 280. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-280>
6. Zhao Y. et al. The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation. *Inflamm. Res.*, 2017, 66(7), 571–578. doi: 10.1007/s00011-017-1032-8
7. Pelekanou V. et al. BAFF, APRIL, TWEAK, BCMA, TACI and Fn14 proteins are related to human glioma tumor grade: Immunohistochemistry and public microarray data meta-analysis. *PLoS One*, 2013, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083250>
8. Gissel B. et al. Identification of avidin and streptavidin binding motifs among peptides selected from a synthetic peptide library consisting solely of D-amino acids. *J. Pept. Sci.*, 1995, 1(4), 217–226. <https://doi.org/10.1002/psc.310010402>
9. Hacker D.E. et al. Highly Constrained Bicyclic Scaffolds for the Discovery of Protease-Stable Peptides via mRNA Display. *ACS Chem. Biol.*, 2017, 12(3), 795–804. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01006>

Comparative Analysis of the Binding Efficiency of Tumor-Targeting Phage Particles to Cancer Cells and Health Brain Cells

M.A. DYMOVA^{1*}, A.A. VOITOVA¹, M.D. DMITRIEVA¹, V.A. RICHTER¹, and E.V. KULIGINA¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Science, Siberian Branch (SB RAS), Novosibirsk, 630090, Russia*

*e-mail: maya.a.rot@gmail.com

Received August 24, 2020

Revised September 18, 2020

Accepted November 15, 2020

Abstract—The binding efficiency of tumor-targeting phage particles, which exhibited tumor-addressing peptides and were obtained by phage display, to the human glioblastoma cell line U-87 MG and health brain cells DKM-5 has been evaluated by flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The specific binding of the selected bacteriophages to U-87 MG cells was shown by fluorescence microscopy. Based on the obtained data, tumor-targeting phage particles were selected that provide the most efficient binding to the U-87 MG cells *in vitro* for further studies in order to create targeted antitumor compounds.

Key words: phage display, tumor-addressing peptides, glioblastoma, flow cytometry, ELISA

Acknowledgments—The authors are grateful to S.I. Baiborodin, Head of the Microscopic Analysis of Biological Objects Core Facilities Center, SB RAS, for assistance in conducting confocal microscopy.

Funding—This study was supported by the Russian Science Fund (grant no. 19-44-02006).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-61-67