



Оригинальное исследование
УДК 615.277.3
<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-3-12>

КЛОФАЗИМИН УСИЛИВАЕТ АНТИГЛИОМНУЮ АКТИВНОСТЬ ТЕМОЗОЛОМИДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

Александра Асадовна Косьянова^{1✉}, Сергей Викторович Зайцев², Олег Игоревич Пак³,
Игорь Степанович Брюховецкий⁴

¹⁻⁴Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

^{1✉}Smirnova_aleksandra@myrambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5655-5855>

²zaitcev.svi@dvfu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0690-7389>

³pak.oi@dvfu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1312-8308>

⁴briukhovetckii.is@dvfu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3654-3069>

Аннотация. Глиобластома – одна из самых агрессивных опухолей головного мозга человека. Прогноз неблагоприятный, эффективность лечения низкая, химиотерапия темозоломидом (ТМЗ) может продлить жизнь больного.

Цель работы: изучить антиглиомную эффективность комбинации клофазимина и целекоксиба с ТМЗ на модели глиобластомы *in vivo*.

Материалы и методы: клетки глиомы С6, обработанные трансформирующим фактором β1, стереотаксически имплантировали в мозг крыс породы Вистар, проводили облучение (20 Гр) в комбинации с введением ТМЗ и ингибиторов Wnt-сигнального пути. Использованы методы нейровизуализационного, иммуоцитохимического, иммуногистохимического анализа, выживаемость животных оценивали по методу Каплана-Майера.

Результаты: обработка клеток С6 глиомы крысы трансформирующим фактором β1 сопровождается увеличением числа элементов иммуореактивных в отношении антигена CD133 и β-катенина, а также уменьшением количества PCNA⁺ опухолевых клеток (ОК). Наименьшие размеры неопластического узла на 30 сутки обнаружены у крыс, получавших химиолучевую терапию совместно с клофазимином. Также в этой группе отмечалось более низкое содержание β-катенина, CD133⁺ и пролиферирующих PCNA⁺ ОК в неопластической ткани по сравнению с другими группами. Наибольшая средняя выживаемость у животных с глиомой отмечена в 4 группе, получавшей химиолучевую терапию совместно с клофазимином.

Клофазимин усиливает антиглиомную активность ТМЗ в эксперименте *in vivo*.

Ключевые слова: глиобластома, темозоломид, клофазимин, целекоксиб, опухолевые стволовые клетки, Wnt-сигнальный путь, ЭМП

Для цитирования: Клофазимин усиливает антиглиомную активность темозоломида в эксперименте *in vivo* / А.А. Косьянова, С.В. Зайцев, О.И. Пак и др. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2023. – № 3. – С. 72-78. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-3-12>.

CLOFAZIMINE STIMULATES THE ANTIGLIOMA EFFECT OF TEMOZOLOMIDE IN AN *IN VIVO* EXPERIMENT

Aleksandra A. Kosianova^{1✉}, Sergei V. Zaitcev², Oleg I. Pak³, Igor S. Bryukhovetskiy⁴

^{1,2,3,4}Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

^{1✉}Smirnova_aleksandra@myrambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5655-5855>

²zaitcev.svi@dvfu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0690-7389>

³pak.oi@dvfu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1312-8308>

⁴briukhovetckii.is@dvfu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3654-3069>

Abstract. Glioblastoma is one of the most aggressive human brain tumours. Prognosis is unfavourable, while treatment is relatively ineffective; temozolomide (TMZ) chemotherapy can prolong patient's life.

Research objective: to assess the antiglioma effect of clofazimine and TMZ combination in an *in vivo* glioblastoma model.



Materials and Methods: C6 glioma cells, treated with transforming growth factor $\beta 1$, were stereotactically implanted in the brain of Wistar rats and irradiated (20 Gy), while also administering TMZ and clofazimine.

Neuroimaging, immunocytochemical, immunohistochemical analysis methods were used, and animal survival was assessed, using the Kaplan-Meier curves.

Results: Treatment of rat glioma C6 cells with TGF- $\beta 1$ increased the number of CD133 antigen and β -catenin immunoreactive elements, and decreased PCNA⁺ in cancer cells (CC). The smallest neoplastic node size on day 30 was found in the rats, treated with a combination of chemoradiotherapy and clofazimine. There was also a lower rate of β -catenin, CD133⁺ and proliferating PCNA⁺ CCs in the neoplastic tissue of this group compared to the other groups. The highest median survival for animals with glioma was observed in the group 4, which received chemoradiotherapy together with clofazimine.

Conclusions. Clofazimine increases the antiglioma effect of TMZ in an in vivo experiment.

Keywords: glioblastoma, temozolomide, clofazimine, celecoxib, cancer stem cells, Wnt-signaling pathway, EMT

For citation: Clofazimine stimulates the antiglioma effect of temozolomide in an in vivo experiment / A.A. Kosianova, S.V. Zaitcev, O.I. Pak, et al. // Far Eastern medical journal. – 2023. – № 3. – P. 72-78. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-3-12>.

Глиобластома (ГБ) – агрессивная глиальная опухоль мозга человека. Существующие методы лечения малоэффективны. Химиотерапия может продлить жизнь больного, наиболее востребован цитотоксический препарат – темозоломид (ТМЗ) [1]. Прогноз неблагоприятный, медиана выживаемости – 15 месяцев [2]. Главной причиной резистентности к лечению являются опухолевые стволовые клетки (ОСК) [3]. Цитостатики, облучение и таргетные препараты не способны эффективно уничтожать ОСК в организме больного, что требует поиска новых лекарственных препаратов и их комбинаций с ТМЗ.

Одним из главных механизмов, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки ОСК, является *Wnt*-сигнальный путь, который играет стратегически важную роль в биологии неопластических клеток [4]. Однако существуют указания [5], что в отличие от клеток ряда карцином, ГБ обладает

довольно низкой чувствительностью к *Wnt*-ингибиторам. При этом нельзя не учесть факт, что большинство таких выводов основано на экспериментах с использованием стандартизованных линий ОК, без учета влияния ионизирующего излучения, продуцируемых опухолью цитокинов и других факторов, резко снижающего степень дифференцировки неопластических клеток [6].

Предложено множество перспективных ингибиторов *Wnt* сигнального пути, но особый интерес в контексте рассматриваемой проблемы представляют репозиционируемые лекарственные препараты с доказанной *Wnt*-ингибирующей активностью: клофазимин [7], и целекоксиб [8].

Цель работы: изучить возможность усиления противоопухолевого действия ТМЗ в комбинации с клофазимином и целекоксибом на экспериментальной модели глиобластомы *in vivo*.

Материалы и методы

В работе использована культура клеток крысиной глиомы C6 (ATCC® CCL-10, США).

Культивирование и обработка ОК трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$). После заморозки клетки культивировали в среде «Dulbecco's Modified Eagle Medium» (DMEM), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1 % антибиотика-антимикотика (Gibco, США). После третьего пассажа прикапывали 10 мкМ/л TGF $\beta 1$ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) инкубировали 48 часов при стандартных условиях (Т 37 °С, 5 % CO₂) и после образования монослоя клетки снимали с помощью ферментативной диссоциации (0,25 % трипсин ЭДТА, Thermo Fisher Scientific, США, 37 °С, 10 мин.), центрифугировали (120 g, 3 мин.) отмывали свежей средой и использовали в эксперименте.

Проточная цитометрия. После стандартной схемы пробоподготовки клетки обрабатывали моноклональными антителами против антигенов CD133, β -катенина и PCNA с доокрашиванием Dapi до и после обработки TGF $\beta 1$ (AB_467471, AB_11219471,

AB_2536771, AB_763613, соответственно, Thermo Fisher Scientific) и проводили анализ позитивных по маркерам клеток на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения «Kaluza Software, 10 UserNetworkPack» (FullVersion) и «ModFit TL» (Verity Software House). Результат выражали в виде процента позитивных по каждому маркеру ОК в образцах до и после обработки TGF $\beta 1$.

Моделирование ГБ у животных

Работа выполнялась на 84 крысах породы Вистар, массой 200–220 г. Содержание и уход за животными осуществлялся в соответствии с требованиями GLP и «Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным». Работа одобрена «Комиссией по биомедицинской этике» Института наук о жизни и биомедицины ДВФУ (протокол № 1 от 13.05.2023).

Животных наркотизировали путем в/б введения смеси (содержащей 200 мкл Золетил/Рометар 1:4). Клетки глиомы (0,3×10⁶ в 5 мкл) имплантировали в область каудопутамена с помощью стереотаксического

аппарата (Narishige, Токио, Япония) в соответствии со стереотаксическими координатами атласа крыс Swanson: Ap-1; Л 3,0; V 4,5, ТБС-2,4 мм. Клетки вводили шприцем Hamilton со скоростью 5 мкл /мин. Опухоль была подтверждена через 10 дней с помощью магнитно-резонансной томографии на аппарате «Bruker's PharmaScan®» (Массачусетс, США).

Нейровизуализация

МРТ головного мозга проводили на МР-томографе «Bruker's PharmaScan®» (Массачусетс, США) под общим наркозом с применением специальной магнитной катушки для мелких лабораторных животных. МРТ выполняли на 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70 дни исследования.

Морфометрия опухоли

Расчет объема опухолевого узла определяли по формуле: $V=4/3\pi \times abc$ где a, b, c – полуоси эллипсоида. Находили срез с максимальной площадью неопластического очага, на котором определяли большую полуось (a) и малую полуось эллипсоида (b). Затем путем суммирования толщины фронтальных срезов на расстоянии от переднего до заднего полюса опухолевого узла находили переднезаднюю полуось (c) и производили вычисления объема опухоли.

Лекарственные препараты. Информация о тестируемых лекарственных препаратах представлена на таблице 1.

Дизайн эксперимента

Животных с первичной опухолью мозга разделили на четыре равные группы ((n=7, по каждой группе):

1 – контрольная группа;

2 – крысы, получавшие облучение в дозе 20 Гр однократно в сочетании с пероральным приемом ТМЗ 20 мг/кг ежедневно, в течение 7 дней;

3 – крысы, получавшие облучение в дозе 20 Гр однократно в сочетании с пероральным приемом ТМЗ 20 мг/кг и целекоксиба, 30 мг/кг, ежедневно в течение 7 дней;

4 – животные, получавшие облучение в дозе 20 Гр однократно в сочетании с пероральным приемом ТМЗ 20 мг/кг и клофазимина 30 мг/кг, ежедневно в течение 7 дней.

Гистологическое исследование. Срезы толщиной 40 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Sigma-Aldrich) по стандартным протоколам. Срезы головного мозга изучали на приборе Leica DM 6000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Иммуногистохимическая характеристика опухолевых узлов в мозге крыс. Срезы опухолевой ткани крыс инкубировали со специфическими гистохимическими антителами PCNA, β -катенин, CD133 (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями фирмы производителя. Препараты изучали с помощью микроскопа AxioScope A1 и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

Оценка выживаемости экспериментальных животных с перевиваемой опухолью проводилась построением кривой Каплана-Майера.

Результаты и обсуждение

1. Иммуноцитохимическая характеристика клеток глиомы С6

Трансформирующий фактор роста β – один из ключевых цитокинов, продуцируемых ОК. Обработка TGF β 1 приводила к некоторому увеличению в культуре числа элементов иммунореактивных в отношении основного маркера опухолевых стволовых клеток – CD133, что сопровождалось снижением пролиферации и увеличением числа ОК иммунореактивных в отношении β -катенина (рис. 1, 2). Клетки контрольной культуры сохраняли типичную для глиомы С6 веретеновидную

форму, при этом клетки, обработанные TGF β 1, быстро распластывались по поверхности планшета, что вероятно является частью программы эпителиально-мезенхимального перехода, запускаемого этим цитокином. Обогащение пула ОК иммунофенотипа CD133⁺ при увеличении числа β -катенин⁺ элементов в культуре после обработки TGF β 1 свидетельствует в пользу снижения общей степени дифференцировки неопластических клеток и возможной активации в них генов *Wnt*-сигнального пути, что создает оптимальные условия для опухолеобразования *in vivo*.

Таблица 1 – Короткая характеристика лекарственных препаратов, используемых в эксперименте

Международное непатентованное название	Производитель	Фармакотерапевтическая группа	IC ₅₀	Ссылка	Формула
Темозоломид	Merck (Германия)	Противоопухолевое средство, алкилирующее соединение	111,6 мкмоль/л	He C et al 2021	
Целекоксиб	Pfizer (США)	НПВС. Высокоselectивный ингибитор ЦОГ-2	>40 мкмоль/л	Xiaohong Fan, et al 2021	
Клофазимин	Merck (Германия)	Средства, активные в отношении микобактерий; противолепрозные средства	≥25 мкмоль/л	Poon, et al 2021	

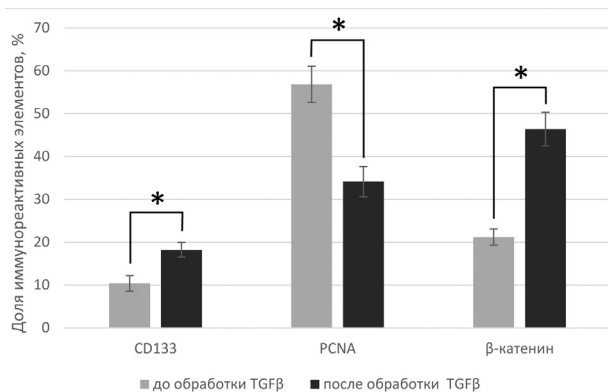


Рис. 1. Иммуноцитохимическая характеристика клеток глиомы С6 до и после обработки TGFβ. *Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$; $M \pm m$, $n=3$

Согласно литературным данным, содержание β-катенина в CD133⁺ ОСК выделенных из глиомасфер в 6–12 раз выше, чем в дифференцированных CD133-

клетках ГБ [9]. Более того, рецептор CD133 может напрямую активировать сигнальную ось PI3K/АКТ/mTOR [10], что ведет к накоплению β-катенина в цитоплазме ОК, что и наблюдалось в нашем исследовании. В свою очередь, увеличение содержания β-катенина активизирует систему TERT киназ, что обеспечивает иммортализацию ОК.

Обращает внимание некоторое снижение пролиферативной активности ОК после стимуляции TGFβ. Данный факт ранее описан в литературе как один из вариантов реакции ОК на воздействие разных концентраций этого цитокина, который в норме оказывает антипролиферативное действие на ОК [11]. Мутации компонентов сигнальных путей TGFβ позволяют ОК уклониться от влияния этого цитокина. В свою очередь распластывание ОК по поверхности планшета указывает на усиление продукции компонентов ВКМ, а также активацию механизмов адгезии, непосредственно связанных с сигнальным путем *Wnt*.

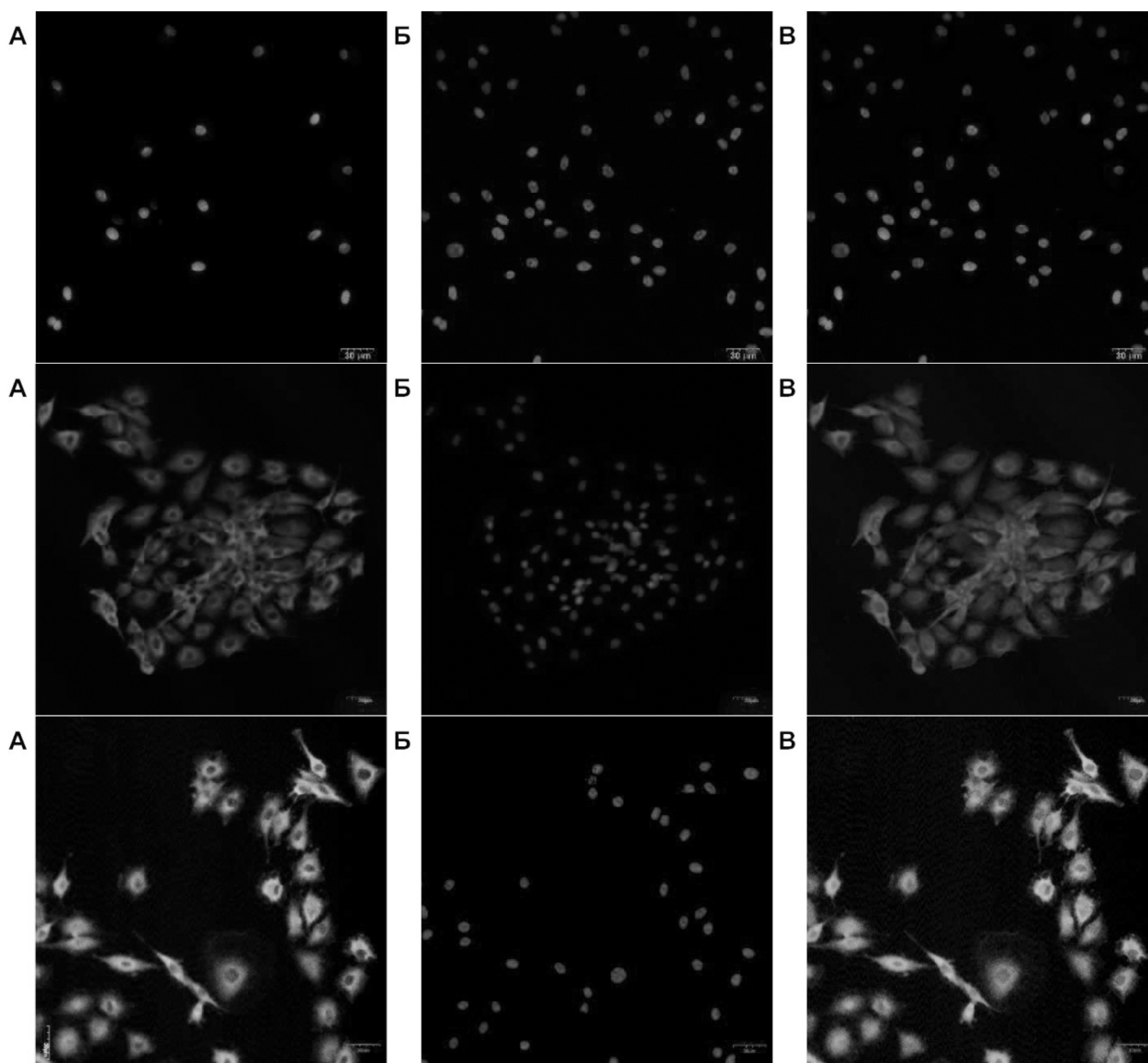


Рис. 2. Иммуноцитохимическая характеристика клеток С6 глиомы крысы после обработки TGFβ1, окраска антителами против – PCNA; β-катенина; CD133. Также показаны объединенные изображения для окрашивания с DAPI. Флуоресцентная лазерная микроскопия

2. Морфометрическая характеристика опухоли в мозге животных

Имплантация клеток глиомы С6 в область каудо-путамена приводила к быстрому формированию объемной опухоли в мозге крысы (рис. 3А, 3Б), хорошо визуализируемой на 14 сутки эксперимента с помощью МРТ. Наименьшие размеры неопластического узла на 30 сутки эксперимента были обнаружены у крыс (рис. 3В), получавших темозоломидом с клофазимином ($98,23 \pm 10,7 \text{ мм}^3$); в группе темозоломид + целекоксиб ($114,65 \pm 9,8 \text{ мм}^3$), размеры опухоли были достоверно ($p < 0,05$) меньше чем в контрольной группе ($226,13 \pm 19,11 \text{ мм}^3$) но, были сопоставимы с группой животных получавших ТМЗ ($124,56 \pm 10,9 \text{ мм}^3$).

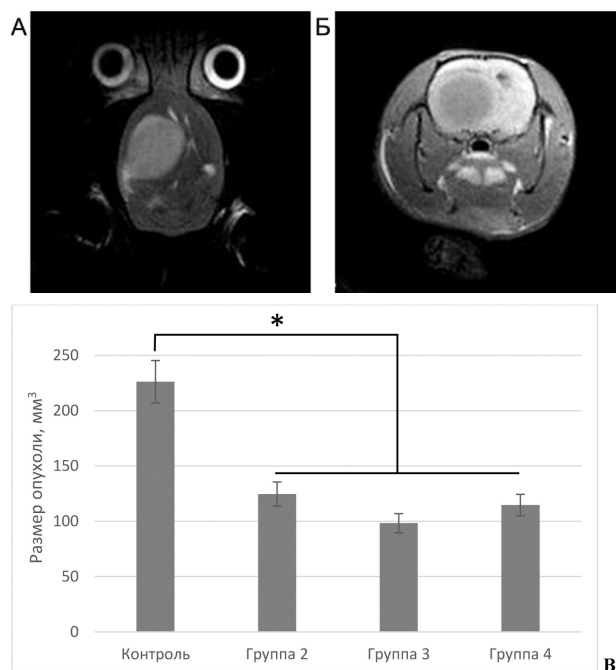


Рис. 3. А, Б – Опухоль в мозге крысы контрольной группы на 14 день с момента имплантации ОК линии С6; В – динамика роста опухоли в контрольной группе, группе 2, группе 3, группе 4. *Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$; $M \pm m$, $n=3$

3. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика

К 14 дню эксперимента у крыс контрольной группы неопластический узел был представлен скоплением клеток различной формы, с ядрами разной величины (рис. 4). В центре опухолевого узла, среди единичных очагов некроза, формировались плотные клеточные конгломераты, в центре которых возникали кровеносные сосуды. По периферии опухоль без четких границ вторгалась в вещество мозга, в котором среди многочисленных участков баллонной дистрофии формировались сателлитные очаги неоплазии, окруженные солитарными ОК.

К 25 дню эксперимента ведущее место в морфологической картине неопластического процесса у животных контрольной группы занимали обширные зоны некроза, окружающие плотные, розеткообразные

скопления ОК вокруг запустевших кровеносных сосудов (рис. 5А). Граница между опухолью и веществом мозга практически отсутствовала, при этом обширные клеточные тяжи вторгались из узла глиомы в прилежащую мозговую ткань, диффузно усеянную ОК. Иммуногистохимическое исследование выявило немногочисленное скопление клеток иммунореактивных в отношении антигенов CD133 и β -катенина, локализованных в периферии опухоли. PCNA⁺ клетки к этому времени были сосредоточены на границе опухоли или равномерно распределены в прилежащем к ней веществе мозга (рис. 5Б, 5В, 5Г).

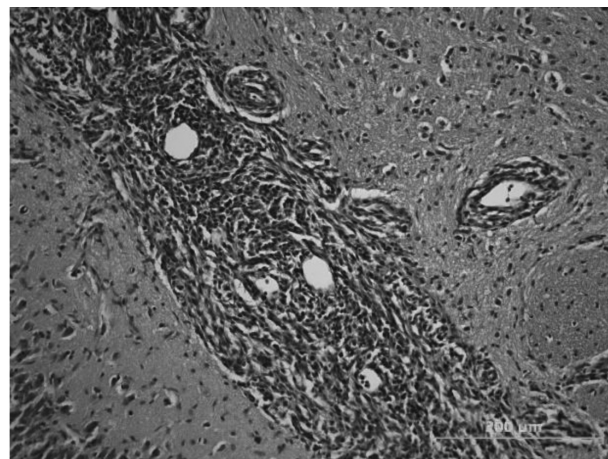


Рис. 4. Морфологическая характеристика неопластического очага в группе контроль на 14 сутки, окраска гематоксилин и эозином

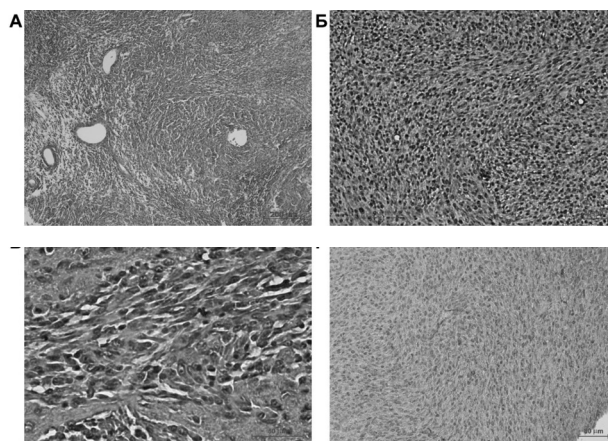


Рис. 5. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика опухоли в группе контроль на 25 день после имплантации ОК. А – окраска гематоксилин-эозином; Б – окрашивание антителами против PCNA, В – CD133, Г – β -катенина

К 25 дню наблюдений во второй группе, у животных, получавших химиолучевую терапию, плотность группировки CD 133⁺ клеток и β -катенин⁺ ОК в центре опухоли уменьшалась, обнаруживая обширные зоны запустевания и некроза, при этом скопления клеток иммунореактивных к CD 133⁺ клеток и β -катенину выявлялись как по краям опухоли, так и далеко в ткани мозга за пределами неопластического узла (рис. 6А, 6Б, 6В).



К 25 дню наблюдений в третьей группе, у крыс, получавших химиолучевую терапию совместно с целекоксибом содержание β -катенина в опухолевой ткани, было ниже по сравнению с контролем и со второй группой, но выше, по сравнению с четвертой группой. Количество $CD133^+$ и $PCNA^+$ клеток также было ниже по сравнению с контролем и другими группами животных, задействованных в эксперименте (рис. 7А, 7Б, 7В).

К 25 дню наблюдений в четвертой группе, у животных, получавших химиолучевую терапию совместно с клофазимином, содержание β -катенина и количество $CD133^+$ ОК в неопластической ткани заметно ниже по сравнению с контролем, при этом число пролиферирующих элементов, иммунореактивных в отношении $PCNA$ было ниже, чем в первой и второй группах (рис. 8А, 8Б, 8В).

Согласно данным литературы [7], текущие результаты лечения крыс четвертой группы могут быть связаны с механизмом подавления клофазимином

Wnt-сигнального пути, а именно с дестабилизацией комплекса β -катенин с Т-клеточным фактором/лимфоидным – энхансерным фактором (TCF/LEF), что препятствует экспрессии *Wnt*-зависимых генов. При этом размер опухоли в мозге крыс, получавших химиолучевую терапию и целекоксиб был сопоставим с аналогичными результатами, полученными у животных, получавших только химиолучевую терапию. Подобный эффект целекоксиба обусловлен дефосфорилированием $GSK-3\beta$, реактивирующей комплекс разрушения β -катенина [9].

4. Выживаемость

Медиана выживаемости у крыс четвертой группы составляла $63,2 \pm 1,2$ дня. В группе крыс, получавших химиолучевую терапию совместно с целекоксибом, медиана выживаемости составляла $45,2 \pm 1,2$ дня, средняя выживаемость была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в контрольной группе ($23,2 \pm 5,2$ дня) но, была сопоставима с группой животных, получавших только химиолучевую терапию ($43,2 \pm 5,2$ дня) (рис. 9).

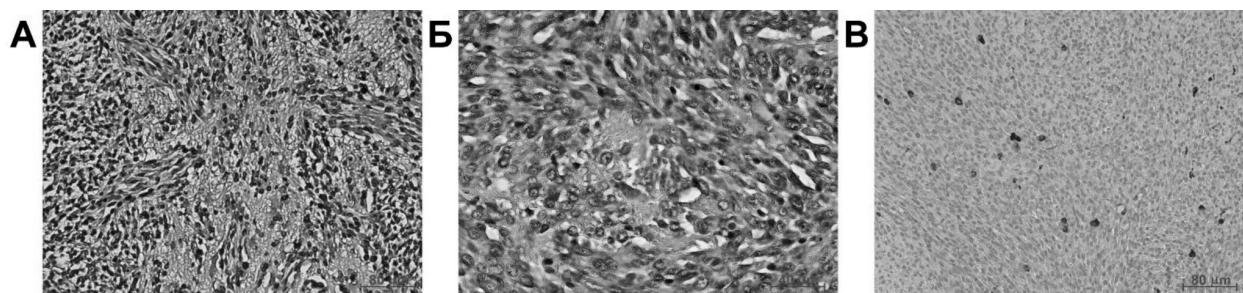


Рис. 6. Иммуногистохимическая характеристика опухоли во второй группе, получавшей химиолучевую терапию, на 25 день после имплантации ОК. Окрашивание антителами против: А – PCNA, Б – CD133, В – β -катенина

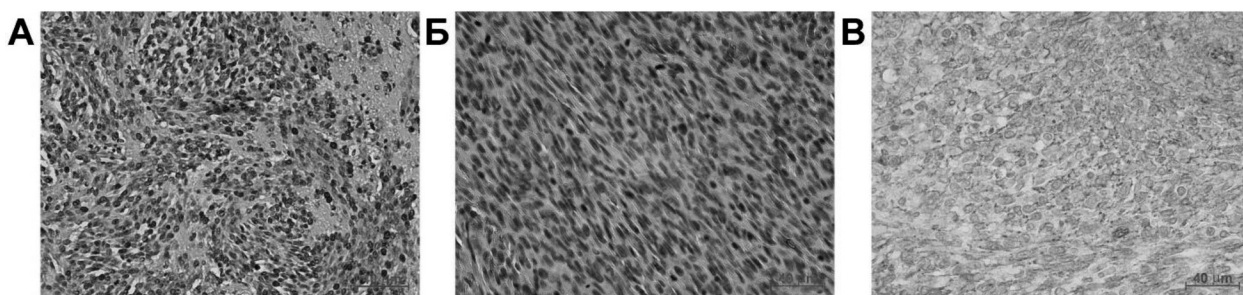


Рис. 7. Иммуногистохимическая характеристика опухоли в третьей группе, получавшей химиолучевую терапию совместно с целекоксибом, на 25 день после имплантации ОК. Окрашивание антителами против: А – PCNA, Б – CD133, В – β -катенина

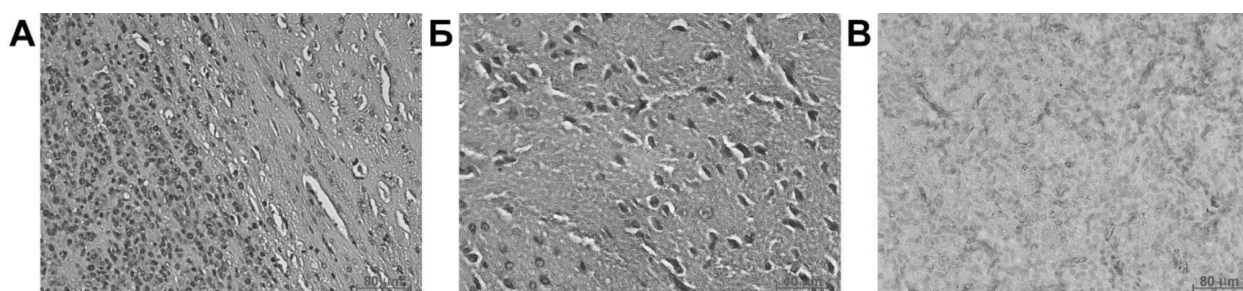


Рис. 8. Иммуногистохимическая характеристика опухоли в четвертой группе, получавшей химиолучевую терапию совместно с клофазимином, на 25 день после имплантации ОК. Окрашивание антителами против: А – PCNA, Б – CD133, В – β -катенина

Результаты текущего исследования свидетельствуют о правильности выбранного пути и требуют дальнейших исследований в этом направлении.

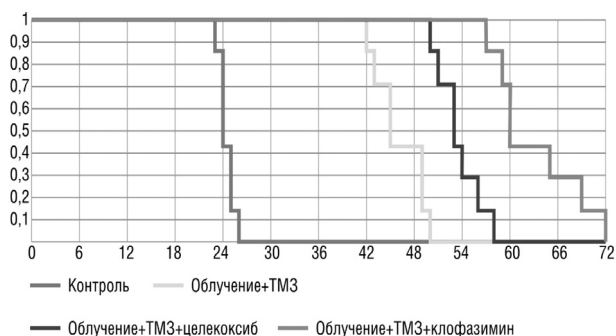


Рис. 9. Выживаемость животных экспериментальных групп по Каплану-Майеру

Выводы

1. Обработка клеток С6 глиомы крысы трансформирующим фактором $\beta 1$ сопровождается увеличением числа элементов иммунореактивных в отношении антигена CD133 и β -катенина, а также уменьшением количества PCNA⁺ОК.

2. Наименьшие размеры неопластического узла на 30 сутки были обнаружены у крыс, получавших химиолучевую терапию совместно с клофазимином.

3. В группе животных, получавших химиолучевую терапию совместно с клофазимином, содержание β -катенина, CD133⁺ и пролиферирующих PCNA⁺ ОК в неопластической ткани было заметно ниже по сравнению с другими группами.

4. Наибольшая средняя выживаемость у животных с глиомой отмечалась в 4 группе, получавшей химиолучевую терапию совместно с клофазимином.

Список источников

1. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma // *N Engl J Med.* – 2005. – Vol. 352, № 10. – P. 987-996.
2. Lukas R.V., Wainwright D.A., Ladomersky E., Sachdev S., Sonabend A.M., Stupp R. Newly diagnosed glioblastoma: A review on clinical management // *Oncology (Williston Park).* – 2019. – Vol. 33. – P. 91-100.
3. Alves A.L.V., Gomes I.N.F., Carloni, A.C., et al. Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives // *Stem Cell Res Ther.* – 2021. – Vol. 12. – P. 206.
4. Rim E.Y., Clevers H., Nusse R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators // *Annu Rev Biochem.* – 2022. – Vol. 9. – P. 571-598.
5. Xu J., Koval A., Katanaev V.L. Beyond TNBC: Repositioning of Clofazimine against a Broad Range of Wnt-Dependent Cancers // *Front Oncol.* – 2020. – Vol. 10. – 602817.
6. Bryukhovetskiy I. Cell-based immunotherapy of glioblastoma multiforme // *Oncol Lett.* – 2022. – Vol. 4. – P. 133.
7. Ahmed K., Koval A., Xu J., Bodmer A., Katanaev V.L. Towards the first targeted therapy for triple-negative breast cancer: Repositioning of clofazimine as a chemotherapy-compatible selective Wnt pathway inhibitor // *Cancer Lett.* – 2019. – Vol. 449. – P. 45-55.
8. Egashira I., Takahashi-Yanaga F., Nishida R., Arioka M., Igawa K., Tomooka K., Nakatsu Y., Tsuzuki T., Nakabeppu Y., Kitazono T., Sasaguri T. Celecoxib and 2,5-dimethylcelecoxib inhibit intestinal cancer growth by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway // *Cancer Sci.* – 2017. – Vol. 108, № 1. – P. 108-115.
9. Shevchenko V., Arnotskaya N., Korneyko M., Zaytsev S., Khotimchenko Y., Sharma H., Bryukhovetskiy I. Proteins of the Wnt signaling pathway as targets for the regulation of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma // *Oncol Rep.* – 2019. – Vol. 41 (5). – P. 3080-3088.
10. Milkina E., Ponomarenko A., Korneyko M., Lyakhova I., Zayats Y., Zaitsev S., Mischenko P., Eliseikina M., Khotimchenko Y., Shevchenko V., Sharma H., Bryukhovetskiy I. Interaction of hematopoietic CD34⁺ CD45⁺ stem cells and cancer cells stimulated by TGF- $\beta 1$ in a model of glioblastoma in vitro // *Oncol Rep.* – 2018. – Vol. 40 (5). – P. 2595-2607.

Вклад авторов:

Брюховецкий И.С., Пак О.И. – идея работы, дизайн исследования;

Косьянова А.А. – постановка экспериментов, обработка материала, написание статьи;

Зайцев С.В. – обработка материала.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors:

Bryukhovetsky I.S., Pak O.I. – idea of the work, research design;

Kosyanova A.A. – setting up experiments, processing material, writing an article;

Zaitsev S.V. – material processing.

The authors declare no conflict of interest.

Статья принята к публикации 11.07.2023.

The article was accepted for publication 11.07.2023.