

Для цитирования: Романишин А.О., Васильев А.А., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Семина Е.В. Комбинированная терапия темозоломидом и онколитическими вирусами потенцирует апоптоз и ингибирует миграционную активность клеток глиобластомы *in vitro*. Сибирский онкологический журнал. 2026; 25(2): 80–93. – doi: 10.21294/1814-4861-2026-25-2-80-93  
For citation: Romanishin A.O., Vasilev A.A., Sysoeva V.Yu., Rubina K.A., Semina E.V. Combination of temozolomide and oncolytic viral therapy potentiates apoptosis and inhibits cell migration of glioblastoma *in vitro*. Siberian Journal of Oncology. 2026; 25(2): 80–93. – doi: 10.21294/1814-4861-2026-25-2-80-93

## КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ТЕМОЗОЛОМИДОМ И ОНКОЛИТИЧЕСКИМИ ВИРУСАМИ ПОТЕНЦИРУЕТ АПОПТОЗ И ИНГИБИРУЕТ МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ *IN VITRO*

А.О. Романишин<sup>1</sup>, А.А. Васильев<sup>1</sup>, В.Ю. Сысоева<sup>2</sup>, К.А. Рубина<sup>2</sup>,  
Е.В. Семина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория трансляционных исследований, ОНК «Институт медицины и наук о жизни», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта»  
Россия, 236041, г. Калининград, ул. Университетская, 2

<sup>2</sup>Лаборатория морфогенеза и репарации тканей, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»  
Россия, 119234, г. Москва, Ломоносовский пр-кт, 27, к. 1

### Аннотация

**Введение.** Глиобlastома (ГБМ) – наиболее агрессивная форма глиомы – остается одним из самых опасных опухолевых заболеваний ЦНС, и, несмотря на существующие стандартные протоколы лечения, медиана выживаемости пациентов остается крайне низкой. Перспективным направлением в терапии ГБМ являются онколитические вирусы: в частности, простая и контролируемая система, основанная на индукции апоптоза с помощью вирусной тимидинкиназы *Herpes simplex* и ганцикловира, система «тимидинкиназа – ганцикловир» (ТК-ГЦВ), представляет значительный терапевтический интерес. Комбинация данного подхода с темозоломидом (ТМЗ), стандартным химиотерапевтическим агентом, позволяет одновременно воздействовать на ключевые механизмы выживания опухолевых клеток: подавление репарации ДНК и активацию апоптотической гибели. Такое комбинированное воздействие потенциально может значительно повысить эффективность терапии глиобlastомы. **Цель исследования** – оценить влияние комбинированного воздействия системы «тимидинкиназа – ганцикловир» (ТК-ГЦВ) и темозоломида (ТМЗ) на жизнеспособность и миграционную активность клеток глиобlastомы (ГБМ) *in vitro*. **Материал и методы.** В работе использовали клеточные линии глиобlastомы человека U87 и U251, линии эпителия почки HEK293T/17 и первичные мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК). Методом генной инженерии на основе плазмиды, кодирующей тимидинкиназу, были получены рекомбинантные вирусные частицы для трансдукции. Для темозоломида (ТМЗ) и ганцикловира (ГЦВ) подобраны оптимальные концентрации. Жизнеспособность оценивали с помощью МТТ-теста; анализ клеточного цикла (фаза G2/M) и экспрессию белка Вах проводили методом проточной цитометрии; экспрессию генов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) – с помощью количественной ПЦР; миграционную активность – в тесте «заживления раны» *in vitro*. **Результаты.** Сочетанное воздействие ТМЗ и системы ТК-ГЦВ приводит к достоверному усилению гибели опухолевых клеток по сравнению с моновоздействием; цитотоксический эффект характеризуется значительным увеличением доли клеток глиобlastом с признаками апоптоза. Среди анализируемых маркеров ЭМП в клетках глиобlastом наиболее выраженное подавление экспрессии наблюдается у генов *CD44*, *ZEB1*, *SNAI1*, *SNAI2* и *VIM*. **Заключение.** Комбинированная терапия темозоломидом и системой ТК-ГЦВ обладает синергетическим эффектом, достоверно увеличивая гибель клеток глиобlastомы и подавляя их миграционную активность по сравнению с применением каждого из агентов в отдельности.

**Ключевые слова:** глиобlastома, темозоломид, онколитические вирусы, миграция.

## COMBINATION OF TEMOZOLOMIDE AND ONCOLYTIC VIRAL THERAPY POTENTIATES APOPTOSIS AND INHIBITS CELL MIGRATION OF GLIOBLASTOMA *IN VITRO*

A.O. Romanishin<sup>1</sup>, A.A. Vasilev<sup>1</sup>, V.Yu. Sysoeva<sup>2</sup>, K.A. Rubina<sup>2</sup>, E.V. Semina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Translational Research, Institute of Medicine and Life Sciences, I. Kant Baltic Federal University

2, Universitetskaya St., Kaliningrad, 236041, Russia

<sup>2</sup>Laboratory of Mechanisms of Morphogenesis and Tissue Repair, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University

27, Bld. 1, Lomonosovsky Prospekt, Moscow, 119234, Russia

### Abstract

**Background.** Glioblastoma (GBM) is the most aggressive and malignant type of glioma, representing the most common and lethal primary central nervous system (CNS) neoplasm in adults. Despite current therapeutic approaches, the median overall survival remains low. Oncolytic virotherapy is a highly promising alternative strategy. One such approach utilizes the *Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase* (HSV-TK) enzyme combined with the prodrug ganciclovir (GCV). This TK-GCV system is converted into a toxic metabolite that induces apoptosis in target cells. Combining the TK-GCV system with temozolomide (TMZ), the standard first-line chemotherapeutic agent for glioma, targets two critical survival mechanisms of GBM: DNA repair and apoptosis regulation. This combination has the potential to significantly improve therapeutic efficacy. **Aim.** We evaluated the impact of combined TK-GCV and TMZ therapy on glioblastoma cell viability and migratory capacity *in vitro*. **Material and Methods.** This work employed the following cell lines: GBM cell lines U87-MG and U251-MG, HEK293T/17 cells, and human mesenchymal stem cells. Recombinant viral particles encoding the thymidine kinase (TK) gene were generated using genetic engineering techniques. Optimal concentrations of TMZ and GCV were determined. Cell viability was assessed using the MTT assay; cell cycle distribution (G2/M phase) and Bax expression were analyzed by flow cytometry; gene expression was quantified via quantitative PCR (qPCR); and cell migration was measured using a wound-healing assay. **Results.** The combination of TMZ and the TK-GCV system results in a significant increase in GBM cell death compared to monotherapy. Specifically, this enhanced cell death is characterized by a higher proportion of apoptotic cells. Furthermore, expression levels of EMT markers such as *CD44*, *ZEB1*, *SNAI1*, *SNAI2*, and *VIM* were significantly reduced under the combined treatment of TK-GCV and TMZ. **Conclusion.** The combination of TK-GCV and TMZ demonstrates a synergistic effect between the two therapeutic approaches. Compared to each method administered separately, the combined treatment results in increased GBM cell death and reduced cell migration.

**Key words:** glioblastoma, temozolomide, oncolytic virus, migration.

### Введение

Глиобластомы (ГБМ) являются одними из наиболее опасных злокачественных новообразований центральной нервной системы. Несмотря на существующий протокол терапии, включающий хирургическую резекцию, лучевую терапию и химиотерапию темозоломидом (ТМЗ), прогноз для пациентов остается неблагоприятным, с медианой выживаемости около 15 мес [1]. Так, резистентность к ТМЗ, обусловленная активностью фермента O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT), является одной из причин низкой выживаемости [2]. Высокая экспрессия MGMT предотвращает способность ТМЗ к повреждению ДНК, что обуславливает высокую степень метилирования промотора MGMT как положительного фактора при ТМЗ терапии [3]. Также одной из ключевых проблем, связанных с патогенезом глиом, является высокий миграционный потенциал клеток ГБМ [4–6], т.к. данное свойство зачастую способствует рецидивам опухоли после ее уда-

ления за счет тропизма клеток ГБМ к сосудам, а также высокому миграционному потенциалу [7, 8]. Не менее важно и то, что такие клетки обладают высокой устойчивостью к химиотерапии из-за низкого пролиферативного потенциала, к иммунотерапии за счет активации TGFβ1 и лучевой терапии вследствие активации сигнального пути ATM/ATR, блокирующего клеточный цикл [9–12]. Поэтому существует необходимость в применении новых подходов для терапии ГБМ.

В последние годы онколитические вирусы (ОВ) стали перспективным направлением в терапии глиом благодаря их способности инфицировать и лизировать опухолевые клетки [13]. В частности, модифицированный вирус герпеса (HSV-1) в сочетании с химиотерапевтическими агентами усиливают апоптоз и иммуногенную гибель клеток [14]. Онколитический препарат является PVSPIRO одним из немногих, разработанных против ГБМ и успешно прошедших I/II фазы клинических испытаний; из-за высокой смертности среди ис-

пытуемых его трансляция в клинику ограничена [NCT01491893]. Однако одним из немногих ОВ, активность которого можно регулировать, является сочетание Тимидинкиназы *H. simplex* и противовирусного препарата ганцикловира (ГЦВ), за счет одновременного нахождения которых в клетке индуцируется апоптоз [15, 16]. Не менее важными являются работы, показывающие, что ОВ также могут воздействовать на опухолевые клетки, обладающие активным миграционным потенциалом, хотя и не в достаточной мере [17–19], поэтому комбинация традиционных методов терапии ГБМ и ОВ, действующих на разные аспекты клеточного метаболизма, является более эффективной.

**Цель исследования** – оценка влияния комбинированного воздействия системы «тимидинкиназа – ганцикловир» (ТК-ГЦВ) и ТМЗ на жизнеспособность и миграционную активность клеток ГБМ *in vitro*.

### Материал и методы

#### Клетки и реагенты

В рамках исследования использованы клеточные линии глиобластомы человека U251-MG (CVC\_0021, Cellosaurus) и U87-MG (GTB-14, ATCC), линия эмбрионального эпителия почки человека НЕК293Т/17 (CRL-11268, ATCC), мезенхимальные стромальные клетки человека (МСК). МСК культивировали в среде DMEM/F12 (10 % Эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС), 1 % L-Глутамин, 1 % Пируват натрия, 1 % Пенициллин/Стрептомицин) (Cargicorn Scientific, Германия). Линейные клетки культивировали в среде DMEM (10 % Эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС), 1 % L-Глутамин, 1 % Пируват натрия, 1 % Пенициллин/Стрептомицин) (Cargicorn Scientific, Германия). Условия культивирования: 95 % Влажности, 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. Среду меняли каждые 3–4 дня. Пассаж клеток МСК не превышал 20. Ганцикловир (ГЦВ) и Темозоломид (ТМЗ) (Sigma Aldrich, США) разводили в DMSO до концентрации 1 [М].

#### Клонирование последовательности гена

#### ТК в плазмиду pTYF-EF1a-DLDH-IRES-eGFP

Кодирующую последовательность гена ТК *H. simplex* (ТК) клонировали в плазмиду pTYF-EF1a-DLDH-IRES-eGFP (#178310, Addgene); последовательность гена ТК амплифицировали из плазмиды p2A2B-tkpuro [20], любезно предоставленной чл.-корр. РАН, д.б.н. А.Н. Томилиным. Наличие вставки ТК подтверждали секвенированием по Сенгеру с помощью прибора Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). Итоговая плазида pTYF-EF1a-TK-IRES-eGFP далее именуется рТК.

#### Сборка лентивирусных векторов и трансдукция клеток

Сборка лентивирусов 3-го поколения осуществлялась за счет одновременной трансфекции 4 плазмид в клетки НЕК 293Т/17. Плазида рТК кодирует ген тимидинкиназы человека, а плазми-

да pTYF-EF1a-GFP – зеленый флуоресцентный белок (GFP), является контрольной (pGFP). Были использованы следующие упаковочные плазмиды: pCER4-tat (AddGene # 12260), pVSV-G (AddGene # 138479), pNHP (AddGene # 85132); сборка лентивирусных частиц и трансдукция клеток были проведены по протоколу [21]. Эффективность трансдукции определяли по экспрессии GFP, используя систему флуоресценции Olympus IX51S8F (Olympus, Япония), а экспрессию гена ТК – методом количественной ПЦР.

#### Определение рабочих концентраций ГЦВ и ТМЗ

Линейные клетки U87 (дикий тип), U87-GFP (трансдуцированные pGFP), U87 (дикий тип), U87-рТК (трансдуцированные рТК), U251 (дикий тип), U251-GFP (трансдуцированные pGFP), U251-рТК (трансдуцированные рТК), МСК (дикий тип), МСК-GFP (трансдуцированные pGFP) и МСК-рТК (трансдуцированные рТК) рассаживали в 96-луночный планшет в количестве  $2 \times 10^3$  клеток на лунку. Использовали среду, соответствующую для каждой из культур, как указано выше. По достижении клетками монослоя в 70 % в среду был добавлен ГЦВ в концентрациях 1, 2, 5 [мкМ]. Эксперимент проводили в 8 технических и 3 независимых повторах для каждой экспериментальной точки. Спустя 5 дней к клеткам добавляли 10 мкл раствора МТТ (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Далее планшет с клетками убирали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 4 часа, после чего в клетки вносили 100 мкл DMSO и убирали планшет повторно в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 30 мин. Интенсивность реакции оценивали с помощью планшетного ридера Clariostar (BMG Labtech, Германия) и поглощение измеряли на длине волны 559 нм.

Клетки U87 и U251 рассаживали на 96-луночный планшет в количестве  $2 \times 10^3$  клеток на лунку. По достижении клетками 70 % монослоя в среду добавляли Темозоломид в концентрациях 50, 100, 150, 200, 250 [мкМ]; эксперимент проводили в 8 технических и 3 независимых повторах. Спустя 5 дней инкубации к клеткам добавляли раствор МТТ (конечная концентрация 0,5 мг/мл). Интенсивность реакции оценивали с помощью планшетного ридера Clariostar (BMG Labtech, Германия) оценили поглощение на длине волны 559 нм.

#### Оценка жизнеспособности клеток

Клетки U87, U251 и МСК рассаживали на 96-луночный планшет в количестве  $2 \times 10^3$  клеток на лунку. По достижении 70 % монослоя в клетки добавляли ГЦВ (5 [мкМ]) и/или Темозоломид (200 [мкМ]). Эксперимент проводили в 8 технических и 3 независимых повторах для каждой экспериментальной точки. Спустя 5 дней инкубации к клеткам добавляли 10 мкл раствора МТТ. После этот планшет поместили в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 4 ч, после чего среду, содержащую МТТ, заменяли на

100 мкл DMSO и убрали планшет повторно в CO<sup>2</sup>-инкубатор на 30 мин. Интенсивность реакции оценивали с помощью планшетного ридера Clariostar (BMG Labtech, Германия), оценили поглощение на длине волны 559 нм.

*Анализ клеточного цикла*

Клетки рассаживали в 12-луночный планшет в количестве 1×10<sup>4</sup> на лунку. По достижении 70 % монослоя в клетки вносили раствор ГЦВ (5 [мкМ]) и/или ТМЗ (200 [мкМ]). Эксперимент проводили в 8 технических и 3 независимых повторах для каждой экспериментальной точки. Спустя 3 дня клетки трипсинизировали и фиксировали в холодном этаноле (70 %), обрабатывали РНКазой А (Magen, Китай) и далее добавляли пропидий йодид (Abscam, США). Оценку клеточного цикла проводили с использованием проточного цитометра Longcyte (ChallenBio, Китай) со следующими параметрами: возбуждение – 488 нм, эмиссия – 620/30 нм. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, США).

*Анализ апоптоза*

Клетки U87, U87-рТК, U251, U251-рТК, МСК, МСК-рТК рассаживали в 12-луночный планшет в количестве 1×10<sup>4</sup> на лунку. По достижении 70 % монослоя в клетки добавляли раствор ГЦВ (5 [мкМ]) и/или ТМЗ (200 [мкМ]). Эксперимент проводили в 8 технических и 3 независимых повторах для каждой экспериментальной точки. Спустя 3 дня клетки были трипсинизированы и зафиксированы в ПФА (4 %). Для окраски использовали комбинацию первичных антител к Vax (Rabbit, 1/200) и вторичных антител Anti-Rabbit AlexaFluor488 (1/400) (Cloud Clone, Китай). Оценку апоптоза проводили с использованием проточного цитометра Longcyte (ChallenBio, Китай) со следующими параметрами: возбуждение – 488 нм, эмиссия – 620/30 нм. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, США).

*Оценка экспрессии маркеров ЭМП методом количественной ПЦР*

Клетки U87, U87-рТК, U251, U251-рТК, МСК, МСК-рТК рассаживали в 6-луночный планшет в количестве 5×10<sup>4</sup> клеток на лунку. По достижении клетками 80 % монослоя к ним добавляли раствор ГЦВ (5 [мкМ]) и/или ТМЗ (200 [мкМ]) 6 технических повторов (2 независимых эксперимента). Спустя 3 дня была выделена РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) (по протоколу производителя) и проведена обратная транскрипция с помощью набора SuperScript IV (Thermo Fischer Scientific, США). В качестве референсного гена был использован *ACTB*. Список всех использованных праймеров для оценки экспрессии генов указан в

табл. 1. Выбор исследуемых генов был основан на анализе данных базы TCGA/Xena Browser (дата обращения – 14.03.2026), базы CGGA (дата обновления – 20.06.2022) и платформы GEPIA2 (дата обновления – 29.05.2021), в т.ч. на приведенных на этих платформах данных о различиях экспрессии между опухолевыми и нормальными образцами.

*Анализ миграции клеток*

*методом заживления раны in vitro*

Клетки U87, U87-рТК, U251, U251-рТК рассаживали в 12-луночный планшет в количестве 1×10<sup>4</sup> на лунку. По достижении 90 % монослоя клетки были оставлены на 24 ч в состоянии депривации. На следующий день клетки промыли теплым физиологическим раствором и нанесли рану носиком для дозатора объемом 200 мкл. Далее к клеткам добавили новую среду и поместили в прибор JuLi Stage (NanoEntek, Южная Корея), позволяющий анализировать миграцию клеток. Условия культивирования поддерживали, как описано выше. В качестве контрольных точек для оценки изменения площади «раны» брали 0 сут (начало эксперимента) и 3 сут (конечная точка). Для каждой из лунок было проанализировано 3 независимых поля зрения. Оценку площади раны проводили с использованием плагина в программе ImageJ.

*Статистический анализ*

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad Software, США). Для расчета рабочей концентрации или полумаксимальной ингибирующей дозы (ИД<sub>50</sub>) веществ применяли нелинейную регрессию, моделируя зависимость «ингибитор – нормализованный ответ». Для сравнения результатов жизнеспособности клеток при добавлении разных комбинаций веществ использовали однофакторный анализ с коррекцией Бонферрони. Для сравнения данных проточной цитометрии использовали однофакторный анализ с коррекцией Туки. Для сравнения данных количественного ПЦР и теста «заживления раны» использовали однофакторный анализ с коррекцией Даннета. На рисунках все значения представлены как среднее значение ± среднее квадратичное отклонение.

Для оценки эффекта сочетанного воздействия комбинации ТМЗ и ТК-ГЦВ использовали формулу Блисса [22]:

$$E_{v.ex.} = E_{TMZ} + E_{TK-GCV} - E_{TMZ} * E_{TK-GCV},$$

где  $E_{v.ex.}$  – это ожидаемый эффект сочетанного воздействия ТМЗ и ТК-ГЦВ;  $E_{TMZ}$  – эффект воздействия ТМЗ;  $E_{TK-GCV}$  – эффект воздействия ТК-ГЦВ. Далее после расчета необходимо сравнить с наблюдаемым эффектом сочетанного воздействия –  $E_{v.ob.}$

$$\begin{cases} E_{v.ex.} > E_{v.ob.} \Rightarrow \text{наблюдаемый эффект обладает антагонистическим характером} \\ E_{v.ex.} \approx E_{v.ob.} \Rightarrow \text{наблюдаемый эффект обладает аддитивным характером} \\ E_{v.ex.} < E_{v.ob.} \Rightarrow \text{наблюдаемый эффект обладает синергитическим характером} \end{cases}$$

Список генов, к которым были подобраны праймеры, для оценки экспрессии  
List of genes for which primers were selected to assess expression

Ген/Gene	Последовательность/ Sequence (5'-3')	Температура плавления/ Melting temperature, °C
<i>CD44</i>	CCAGAAGGAACAGTGGTTTGG ACTGTCCTCTGGGCTTGGTG	61,5
<i>NCAM1</i>	CATCACCTGGAGGACTTCTACC CAGTGTACTGGATGCTCTTCAGG	61,5
<i>ZEB1</i>	GGCATAACCTACTCAACTACG TGGGCGGTGTAGAATCAGAG	58,6
<i>ZEB2</i>	AATGCACAGAGTGTGGCAAGG CTGCTGATGTGCGAACTGTAGG	62,1
<i>SNAI1</i>	GCGAGCTGCAGGACTCTAAT CATCTGACAGGGAGGTCAGC	58
<i>SNAI2</i>	ATCTGCGGCAAGGCGTTTTTC GAGCCCTCAGATTTGACCTGT	60,5
<i>CDH1</i>	GGCTGGACCGAGAGAGTTT ACGACGTTAGCCTCGTTCTC	58,9
<i>CDH2</i>	ATGGGAAATGGAACTTGATGG CAGTTGCTAAACTTCACTGAAAGG	58,4
<i>VIM</i>	ACGTCTTGACCTTGAACGCA TCTTGGCAGCCACACTTTCA	58,8
<i>SOX2</i>	GTTCATGTGCGCGTAACTG GAAGGATAAGTACACGCTGC	54,8
<i>TK</i>	CTGCGGGTTTATATAGACGG TGTTTCGCGATTGTCTCGG	54,4
<i>ACTB</i>	ACACCTTCTACAATGAGCTG CATGATGGAGTTGAAGGTAG	52,1

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

## Результаты

### Создание клеточных линий, экспрессирующих рТК

Корректность сборки рекомбинантного лентивирусного вектора рТК подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру (рис. 1). Трансдукция клеток подтверждена с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 2А). Экспрессия также подтверждена методом количественной ПЦР (рис. 2Б). Экспрессия тимидинкиназы *H. simplex* в нетрансдуцированных клетках была равна 0, т.к. ген рТК в геноме *H. Sapiens* отсутствует.

### Комбинированное применение ТК-ГЦВ и ТМЗ увеличивает гибель клеток глиобластомы по сравнению с монотерапией

Нами высказано предположение о повышенной чувствительности клеток глиомы к комбинированному воздействию темозоломида (ТМЗ) и системы ТК-ГЦВ по сравнению с действием каждого агента в отдельности [23, 24]. Для подтверждения этой гипотезы нами определена ИД50 в отношении клеток ГБМ для ТМЗ, которая составила приблизительно 200 [мкМ] (Приложение 1А – в дополнениях к электронной версии статьи). Параллельно на клетках ГБМ и МСК установлена максимально

переносимая концентрация ганцикловира (ГЦВ), не вызывающая значительного цитотоксического эффекта в нетрансдуцированных клетках, – 5 [мкМ] (Приложение 1Б – в дополнениях к электронной версии статьи). В последующей серии экспериментов нами подобрана оптимальная концентрация ГЦВ, приводящая к выраженной гибели клеток ГБМ к 5-му дню наблюдения (Приложение 1В – в дополнениях к электронной версии статьи). Таким образом, для всех последующих экспериментов были выбраны концентрации 200 [мкМ] для ТМЗ и 5 [мкМ] для ГЦВ.

Далее проведено сравнение эффективности работы системы ТК-ГЦВ и ТМЗ в комбинации на клеточных линиях U87, U251 и МСК (рис. 3). При этом комбинаторный эффект ТК-ГЦВ и ТМЗ в отношении МСК клеток, как модели здоровых клеток, оказался сравним с аналогичным эффектом ТК-ГЦВ в клетках ГБМ, что указывает на необходимость поиска способов усиления специфичности эффекта в отношении клеток ГБМ. Использование модели Блисса показало, что наблюдаемый комбинаторный эффект обладает признаками аддитивного эффекта во всех трех клеточных линиях (табл. 2).

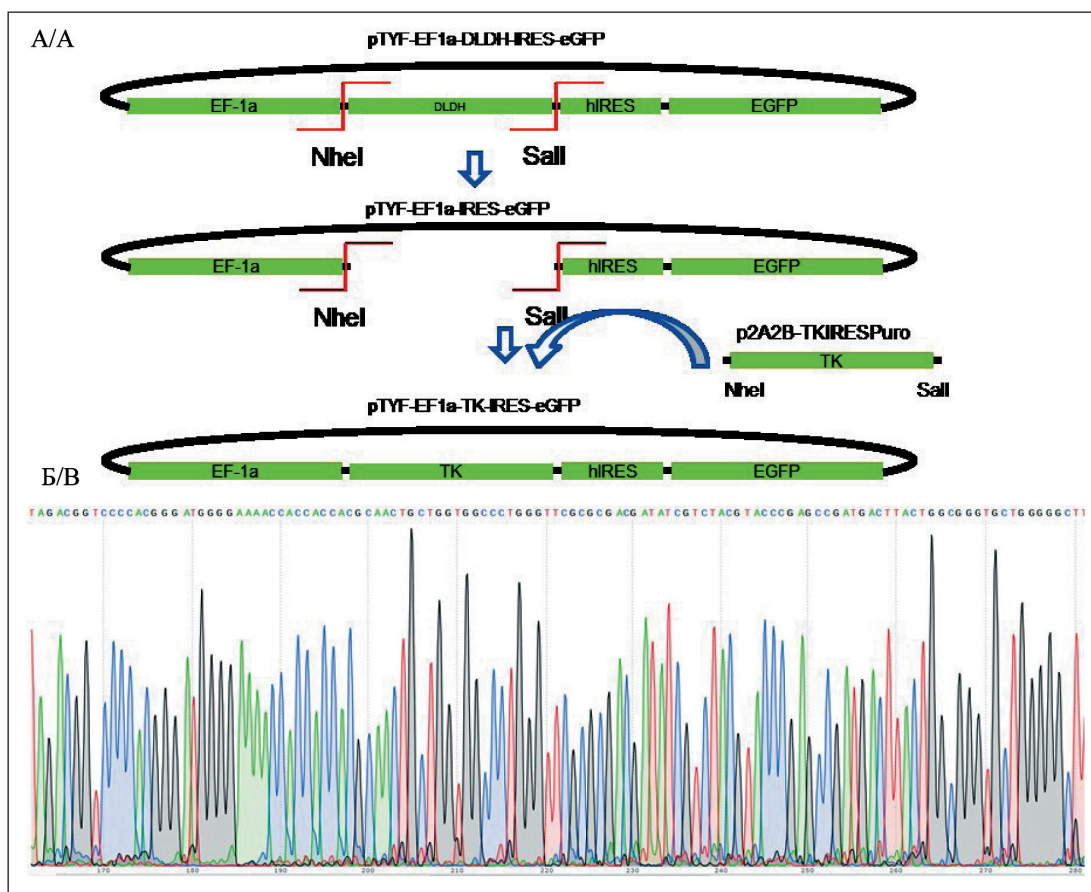


Рис. 1. А. Дизайн клонирования последовательности *TK* в плазмиду pTYF-EF1a-DLDH-IRES-eGFP; Б. Хроматограмма последовательности *TK* с 3'-конца. Примечание: рисунок выполнен авторами  
 Fig. 1. A. TK cloning design into pTYF.EF1a-DLDH-IRES-eGFP. B. Chromatographic sequence of *TK* starting at 3'-end.  
 Note: created by the authors

*Комбинация ТК-ГЦВ и ТМЗ эффективнее индуцирует апоптоз в линиях U87 и U251, чем монотерапия этими методами*

Далее мы провели сравнительную оценку апоптоза на основе экспрессии Вах (рис. 4), (Приложение 2 – в дополнениях к электронной версии статьи). Обнаружено, что комбинированное действие системы ТК-ГЦВ и ТМЗ достоверно повышает экспрессию

Вах в сравнении с клетками, обработанными ТМЗ. Так, у трансдуцированных клеток ГБМ экспрессия Вах между ТК-ГЦВ и комбинацией ТК-ГЦВ и ТМЗ отличается незначительно ( $p > 0,05$ ). При этом накопление апоптотических клеток ГБМ больше, чем у клеток МСК. При этом оценка комбинаторного воздействия ТМЗ и ТК-ГЦВ указывает на возможный аддитивный эффект (табл. 3).

Таблица 2/Table 2

**Оценка комбинаторного эффекта ингибирования жизнеспособности клеток ТМЗ и ТК-ГЦВ с помощью модели Бласса**

**Evaluation of the combinatorial effect of inhibition of TMZ and TK-GCV cell viability using the Bliss model**

Клеточная модель/ Cell Model	Средний эффект ТМЗ/ Mean TMZ effect	Средний эффект ТК-ГЦВ/ Mean TK-GCV effect	Ожидаемый эффект при сочетанном воздействии/ Combined expected effect	Средний наблюдаемый эффект при сочетанном воздействии/ Mean combined observed effect	Эффект/ Effect
U87	0,36	0,41	0,6224	0,6	Аддитивность/ Additivity
U251	0,37	0,39	0,6157	0,59	Аддитивность/ Additivity
МСК/MSK	0,31	0,23	0,4687	0,5	Аддитивность/ Additivity

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

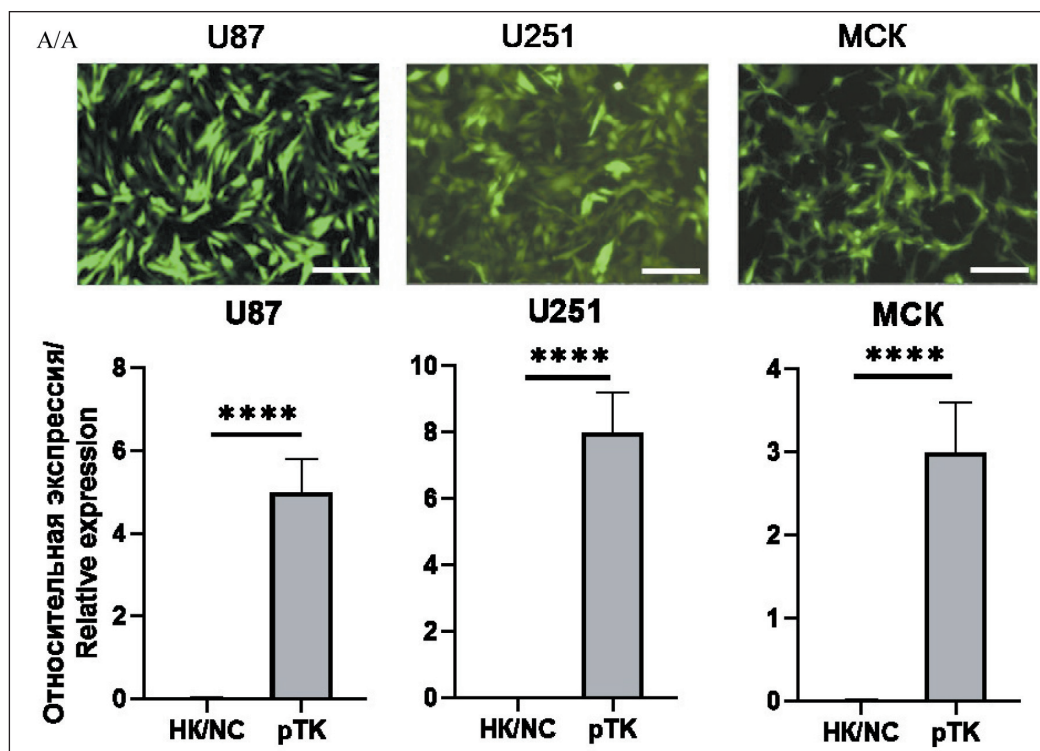


Рис. 2. Подтверждение экспрессии конструкции pTK после трансдукции линейных клеток ГБМ и первичных клеток МСК лентивирусом, кодирующим ТК: А. Микрофотографии клеточных линий, трансдуцированных лентивирусом pTK, экспрессирующие GFP (объектив – ×10, масштабная линейка – 250 мкм); Б. Анализ относительной экспрессии pTK в клетках ГБМ и МСК; НК – негативный контроль (клетки дикого типа); pTK – клетки, трансдуцированные pTK (n=6; \*\*\*\* – p<0,001).

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 2. Confirmation of pTK expression after transduction of GBM and MSC cells with lentivirus encoding TK. A. Microphotographic images of cell lines, transduced with pTK lentivirus, which express GFP (magnification – ×10, scale bar – 250 μm). B. Analysis of relative pTK expression in GBM and MSC cells. NC – negative controls (wild type cells); pTK – cells transduced with pTK (n=6; \*\*\*\* – p<0,001). Note: created by the authors

Далее, исследуя комбинированное воздействие ТК-ГЦВ и TMZ в отношении клеток ГБМ и МСК, мы обнаружили, что система ТК-ГЦВ вызывает достоверное ингибирование клеточного цикла в фазе G2/M (рис. 5), (Приложение 3 – в дополнениях к электронной версии статьи). Эти результаты указывают на накопление большого количества

ошибок, произошедших в результате репликации, которые приводят к остановке клеточного цикла в последующей фазе G2. Учитывая предыдущие результаты, можно сделать вывод о том, что комбинация системы ТК-ГЦВ и TMZ оказывает более выраженное действие на гибель опухолевых клеток, чем монотерапия.

Таблица 3/ Table 3

Оценка комбинаторного эффекта увеличения апоптоза клеток TMZ и ТК-ГЦВ с помощью модели Блисса

Evaluation of the combinatorial effect of increasing apoptosis of TMZ and TK-GCV cells using the Bliss model

Клеточная модель/ Cell Model	Средний эффект TMZ/ Mean TMZ effect	Средний эффект ТК-ГЦВ/ Mean TK-GCV effect	Ожидаемый эффект при сочетанном воздействии/ Combined expected effect	Средний наблюдаемый эффект при сочетанном воздействии/ Mean combined observed effect	Эффект/ Effect
U87	0,07	0,13	0,19	0,17	Аддитивность/ Additivity
U251	0,04	0,19	0,23	0,22	Аддитивность/ Additivity
МСК/MSC	0,06	0,10	0,16	0,17	Аддитивность/ Additivity

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

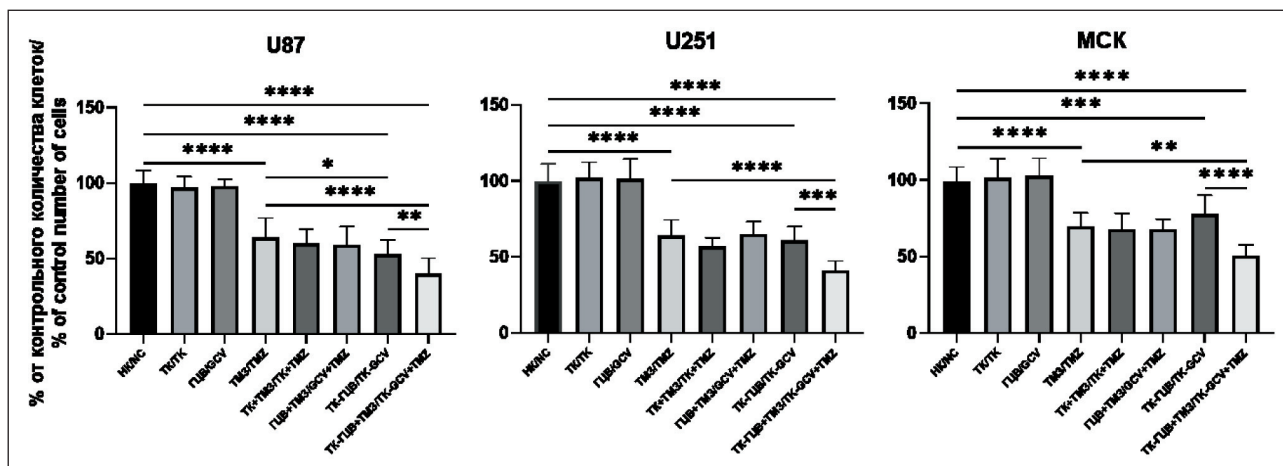
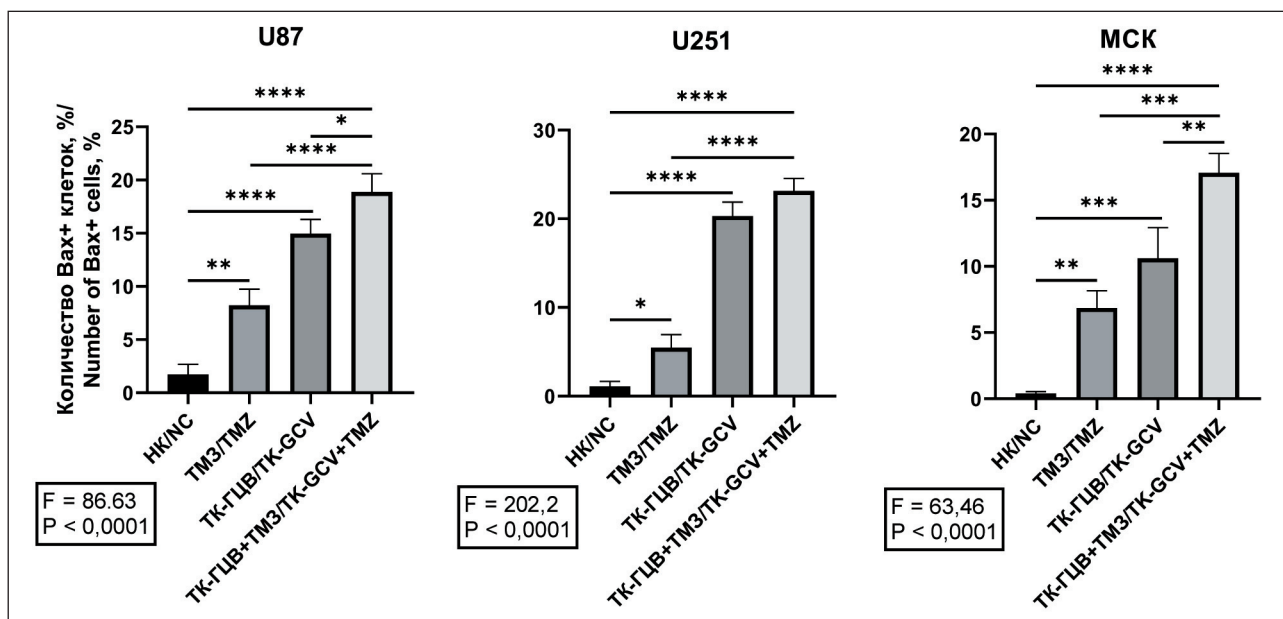


Рис. 3. Оценка жизнеспособности клеток при различных условиях терапии: НК – негативный контроль (дикий тип); ТК – клетки, трансдуцированные рТК; ГЦВ – клетки дикого типа, к которым добавили ГЦВ; TMZ – клетки дикого типа, к которым добавили TMZ; ТК + TMZ – клетки, трансдуцированные рТК, к которым добавили TMZ; ГЦВ + TMZ – клетки дикого типа, к которым добавили ГЦВ и TMZ; ТК-ГЦВ – клетки, трансдуцированные рТК, к которым добавили ГЦВ; ТК-ГЦВ + TMZ – клетки, трансдуцированные рТК, к которым добавили ГЦВ и TMZ. Однофакторный анализ с коррекцией Бонферони. Для U87:  $F=71,75$ ,  $p<0,0001$ ; для U251:  $F=49,54$ ,  $p<0,0001$  (\* –  $p<0,05$ ; \*\* –  $p<0,01$ ; \*\*\* –  $p<0,005$ ; \*\*\*\* –  $p<0,001$ ;  $n=8$ ).

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 3. Cell viability under different conditions. NC – negative control (wild type cells), TK – pTK transduced cells, GCV – wild type cells under GCV treatment, TMZ – wild type cells under TMZ treatment, TK + TMZ – pTK transduced cells under TMZ treatment, GCV + TMZ – wild type cells under combined GCV and TMZ treatment, TK-GCV – pTK transduced cells under GCV treatment, TK-GCV + TMZ – pTK transduced cells under combined GCV and TMZ treatment. One-way ANOVA (Bonferroni correction) (\* –  $p<0,05$ ; \*\* –  $p<0,01$ ; \*\*\* –  $p<0,005$ ; \*\*\*\* –  $p<0,001$ ;  $n=8$ ).

Note: created by the authors



$F = 86,63$   
 $P < 0,0001$

$F = 202,2$   
 $P < 0,0001$

$F = 63,46$   
 $P < 0,0001$

Рис. 4. Оценка содержания Bax+ клеток при различных условиях воздействия: НК – негативный контроль (дикий тип); TMZ – клетки дикого типа, к которым добавили TMZ; ТК-ГЦВ – клетки, трансдуцированные рТК, к которым добавили ГЦВ; ТК-ГЦВ + TMZ – клетки, трансдуцированные рТК, к которым добавили ГЦВ и TMZ. Однофакторный анализ с коррекцией Туки (\* –  $p<0,05$ ; \*\* –  $p<0,01$ ; \*\*\* –  $p<0,005$ ; \*\*\*\* –  $p<0,001$ ;  $n=3$ ). Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 4. Analysis of Bax+ cells amount under different conditions. NC – negative control (wild type cells); TMZ – wild type cells under TMZ treatment; TK-GCV – pTK transduced cells under GCV treatment; TK-GCV + TMZ – pTK transduced cells, under combined TK and TMZ treatment. One-way ANOVA with Tukey correction (\* –  $p<0,05$ ; \*\* –  $p<0,01$ ; \*\*\* –  $p<0,005$ ; \*\*\*\* –  $p<0,001$ ;  $n=3$ ).

Note: created by the authors

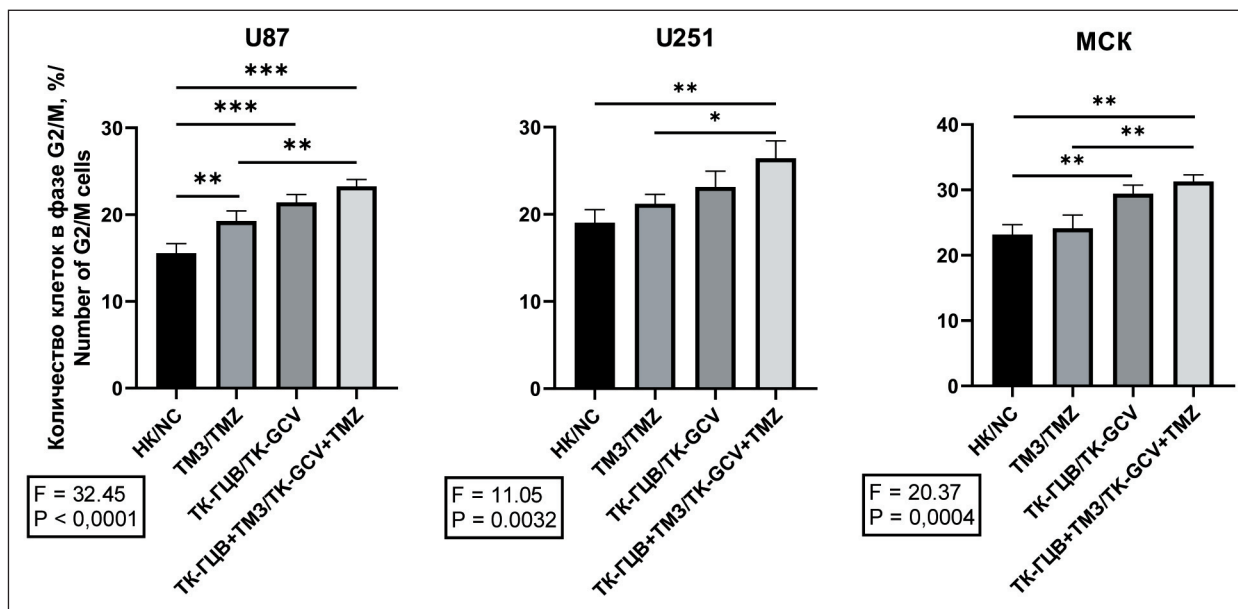


Рис. 5. Анализ ингибирования клеточного цикла клеток ГБМ и МСК при различных условиях терапии: НК – негативный контроль (клетки дикого типа); TM3 – клетки дикого типа, к которым добавили TM3; ТК-ГЦВ – клетки, трансдуцированные pTK, к которым добавили ГЦВ; ТК-ГЦВ + TM3 – трансдуцированные клетки, к которым добавили ГЦВ и TM3. Однофакторный анализ с коррекцией Туки (\* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,005; n =4). Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 5. Analysis of G2/M inhibition of cells under different conditions. NC – negative control (wild type cells); TM3 – wild type cells under TMZ treatment; TK-GCV – pTK transduced cells under GCV treatment; TK-GCV + TMZ – pTK transduced cells, under combined TK and TMZ treatment. One-way ANOVA with Tukey correction (\* – p<0.05; \*\* – p<0.01; \*\*\* – p<0.005; n=4).

Note: created by the authors

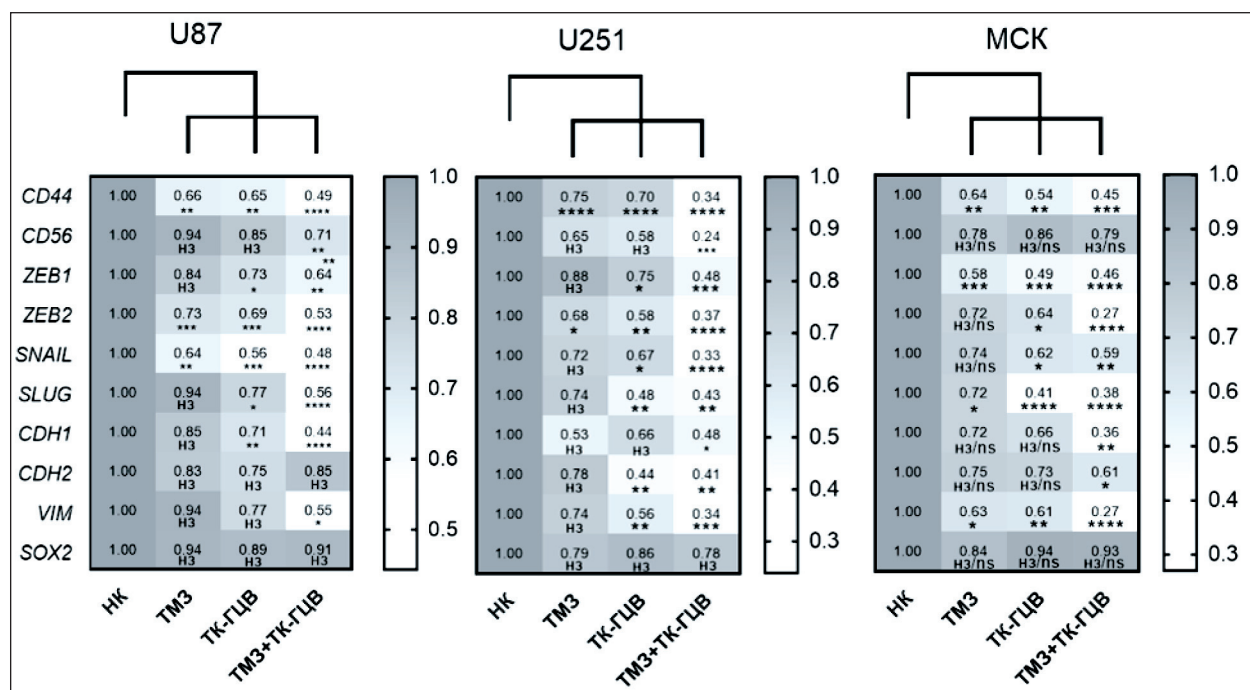


Рис. 6. Анализ относительной экспрессии генов, ассоциированных с ЭМП и стволовостью: НК – негативный контроль (клетки дикого типа); TM3 – клетки дикого типа, к которым добавили TM3; ТК-ГЦВ – трансдуцированные клетки, к которым добавили ГЦВ; ТК-ГЦВ + TM3 – трансдуцированные клетки, к которым добавили ГЦВ и TM3. Однофакторный анализ с коррекцией Даннетта (\* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,005, \*\*\*\* – p<0,001; n=6). Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 6. Analysis of relative expression of EMT and stemness-associated genes expression. NC – negative control (wild type cells); TM3 – wild type cells under TMZ treatment; TK-GCV – pTK transduced cells under GCV treatment; TK-GCV + TMZ – pTK transduced cells, under combined TK and TMZ treatment. One-way ANOVA with Dunnett correction (\* – p<0.05; \*\* – p<0.01; \*\*\* – p<0.005, \*\*\*\* – p<0.001; n=6).

Note: created by the authors

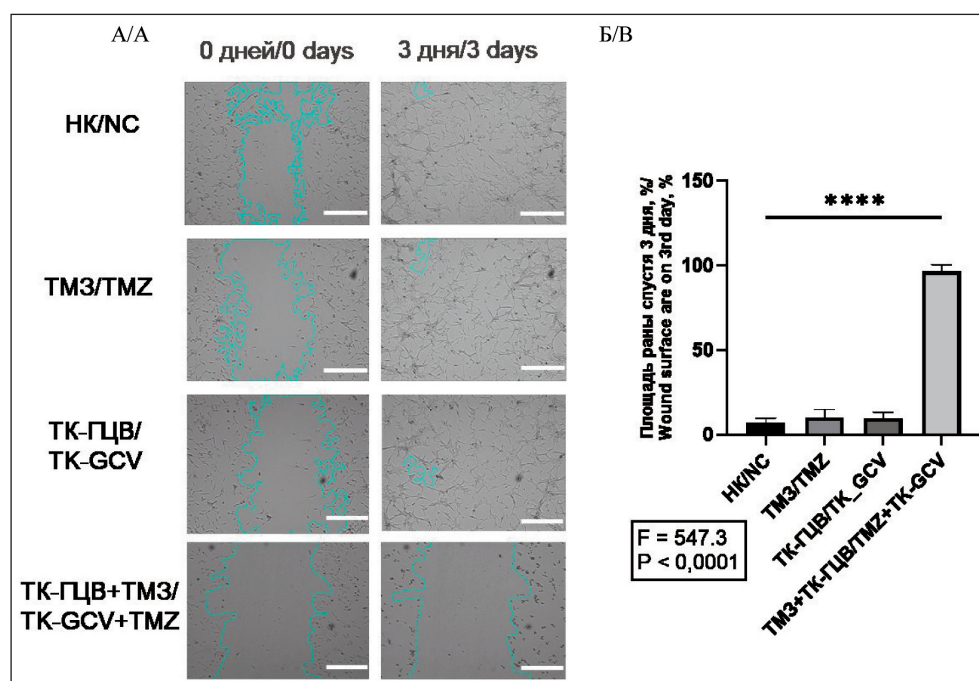


Рис. 7. Анализ миграции клеток U87 при различных условиях культивирования: А. Микрофотографии клеток U87 с обозначенными границами раны (объектив –  $\times 4$ ; масштабная линейка – 800 мкм);

В. Статистический анализ миграции клеток U87; НК – негативный контроль (клетки дикого типа); TM3 – клетки дикого типа, к которым добавили TM3; ТК-ГЦВ – трансдуцированные клетки, к которым добавили ГЦВ; ТК-ГЦВ + TM3 – трансдуцированные клетки, к которым добавили ГЦВ и TM3. Однофакторный анализ с коррекцией Даннета (\*\*\*\* –  $p < 0,001$ ,  $n=6$ ). Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 7. Cell migration analysis of U87 cells under different conditions.

A. Microphotographic images of U87 with highlighted wound edge (magnification –  $\times 4$ , scale bar – 800  $\mu\text{m}$ ). B. U87 cell migration statistical analysis. NC – negative control (wild type cells); TM3 – wild type cells under TMZ treatment; TK-GCV – pTK transduced cells under GCV treatment; TK-GCV + TM3 – pTK transduced cells, under combined TK and TMZ treatment. One-way ANOVA with Dunnett correction (\*\*\*\* –  $p < 0.001$ ;  $n=6$ ). Note: created by the authors

По сравнению с монотерапией, комбинация ТК-ГЦВ и TM3 приводит к значительному снижению экспрессии генов ЭМП и ингибированию миграции клеток глиобластомы

Далее, при анализе генов, ассоциированных с ЭМП, мы показали, что экспрессия генов *CD56* (в U87 клетках – в 1,40 раза, в U251 – в 4,16 раза, в МСК – нет изменений), *ZEB1* (в U87 – в 1,56 раза, в U251 – 2,08 раза, в МСК – в 5,00 раз), *SNAIL* (в U87 – в 2,08 раза, в U251 – в 3,00 раза, в МСК – в 2,43 раза), *SLUG* (в U87 – в 1,78 раза, в U251 – в 2,32 раза, в МСК – в 3,33 раза), *VIM* (в U87 – в 1,81 раза, в U251 – в 2,94 раза, в МСК – в 3,70 раза) достоверно снижена при комбинировании подходов ТК-ГЦВ и TM3 (рис. 6), (Приложение 4 – в дополнениях к электронной версии статьи). Анализ клеточной миграции в модели «заживления раны» выявил, что комбинированный режим ТК-ГЦВ+TM3 оказывает более сильное ингибирующее действие на подвижность клеток U87 (рис. 7) и U251 (рис. 8), чем каждый из агентов в отдельности (в сравнении с негативным контролем).

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать вывод о том, что снижение экспрессии генов *CD44*, *ZEB1*, *SNAIL*, *SLUG* и *VIM* в

наибольшей степени ассоциировано с подавлением миграции клеток глиобластомы.

### Обсуждение

Полученные результаты показали, что комбинированное применение TM3 и системы ТК-ГЦВ оказывает синергетический эффект на клетки глиобластомы, не только усиливая их гибель, но и подавляя миграционный потенциал. Это особенно значимо в контексте ограниченной эффективности стандартной терапии. Несмотря на то, что TM3 остается препаратом I линии лечения ГБМ, его действие зачастую недостаточно из-за таких факторов, как высокая экспрессия *MGMT* и резистентность со стороны опухолевых стволовых клеток. Предлагаемая комбинированная стратегия может стать подходом к преодолению этой резистентности [25]. Одной из основных причин его клинического применения является относительная безопасность и отсутствие широкого спектра побочных эффектов в сравнении с другими одобренными препаратами в отношении глиобластом [26]. Полученные нами данные, согласующиеся с результатами других исследований, демонстрируют дифференциальную чувствительность исследуемых клеточных линий к TM3. Препарат значительно снижает жизнеспособ-

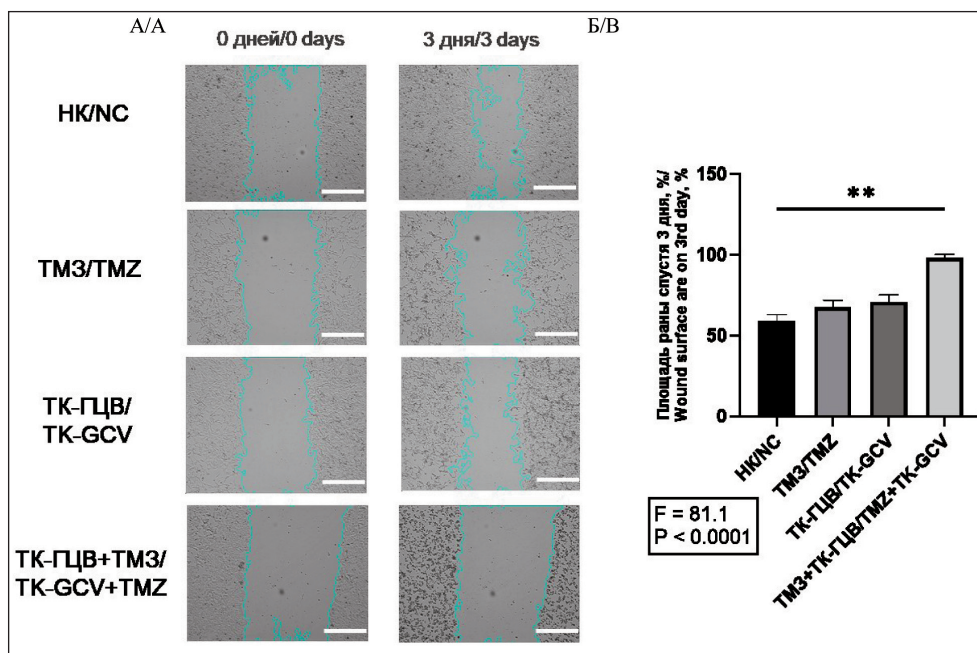


Рис. 8. Анализ миграции клеток U251 при различных условиях культивирования: А. Микрофотографии клеток U251 с обозначенными границами раны (объектив –  $\times 4$ ; масштабная линейка – 800 мкм); В. Статистический анализ миграции клеток U251; НК – негативный контроль (клетки дикого типа); TMZ – клетки дикого типа, к которым добавили TMZ; ТК-ГЦВ – трансдуцированные клетки, к которым добавили ГЦВ; ТК-ГЦВ + TMZ – трансдуцированные клетки, к которым добавили ГЦВ и TMZ. Однофакторный анализ с коррекцией Даннета (\*\* –  $p < 0,01$ ,  $n=6$ ).

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 8. Cell migration analysis of U251 cells under different conditions.

A. Microphotographic images of U251 with highlighted wound edge (magnification – 4x, scale bar – 800  $\mu\text{m}$ ). B. U251 cell migration statistical analysis. NC – negative control (wild type cells); TMZ – wild type cells under TMZ treatment; TK-GCV – pTK transduced cells under GCV treatment; TK-GCV + TMZ – pTK transduced cells, under combined TK and TMZ treatment. One-way ANOVA with Dunnett correction (\*\* –  $p < 0.01$ ,  $n=6$ ). Note: created by the authors

ность клеток глиобластомы U87 и U251, при этом проявляя меньшую цитотоксичность в отношении мезенхимальных стромальных клеток. Интересно, что линия U251 оказалась более чувствительной к действию TMZ, чем U87, что обосновывается генетическими различиями между сравниваемыми клеточными линиями глиобластом. В частности, некоторые работы указывают на отличия между линиями по метилированию гена *MGMT* и наличию мутантных аллелей гена *TP53* [27, 28]. Для валидации этих перспективных подходов представляется актуальным переход на первичные культуры клеток глиобластомы, которые являются более релевантной биологической моделью для доклинического скрининга [29].

Онколитические вирусы для терапии ГБМ получили свое признание не так давно, поэтому их клиническое применение пока ограничено [15]. Такие ОВ, как PVSPIRO, Vaccina Virus, DNX-201, находятся в процессе проведения клинических испытаний, но даже они уже показали определенные недостатки/ограничения, поэтому комбинированные подходы, сочетающие цитостатики и ОВ, являются наиболее перспективными [30]. В проведенных экспериментах мы показали, что комбинация TMZ и ТК-ГЦВ более эффективно снижает жизнеспособность клеток ГБМ, одновременно с

этим подавляет их подвижность. Аналогичные результаты получены ранее на примерах ГБМ крыс – линии BT4C [31] или С6 [32]. В данном исследовании мы подтвердили известные эффекты на новых моделях, используя линии клеток глиобластомы человека и мезенхимальные стромальные клетки в качестве контроля. Выявленное подавление экспрессии генов, ассоциированных с ЭМП, и ингибирование клеточной миграции указывают на потенциальный антиметастатический эффект комбинированной терапии. Важно отметить, что наблюдаемое снижение миграционной способности может быть вторичным следствием генерализованной цитотоксичности, индуцированной системой ТК-ГЦВ, что согласуется с высокой частотой однонуклеотидных полиморфизмов, характерной для использованных клеточных линий. При этом ранее в этом году уже было доказано, что ОВ позволяют эффективно воздействовать на стволовые клетки ГБМ, вследствие чего возможно подавление как их стволовых свойств, так и миграционной активности [33]. Аналогичный результат был выявлен при использовании ОВ для восстановления экспрессии гена *PTEN*, являющегося одним из ключевых в подавлении развития ГБМ [34]. Кроме того, отсутствие изменений в экспрессии маркера стволовости *SOX2* позволяет

предположить, что популяция опухолевых стволовых клеток глиобластомы может сохранять резистентность к данному воздействию, что требует дальнейшего изучения.

### Заключение

Настоящее исследование демонстрирует, что комбинированное применение ТК-ГЦВ и TMZ оказывает более выраженный цитотоксический и антимиграционный эффект на клетки глиобла-

стомы, чем монотерапия каждым из этих агентов. Однако наблюдаемая эффективность в значительной степени не является селективной, поскольку аналогичное воздействие зафиксировано и на культуре мезенхимальных стромальных клеток. Это указывает на необходимость дальнейшей разработки стратегий для защиты нормальных тканей, например путем таргетной доставки или поиска дополнительных агентов, повышающих избирательность воздействия на опухоль.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

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., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R.O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 10; 352(10): 987–96. doi: 10.1056/NEJMoa043330.
2. Ботезату И.В., Кондратова В.Н., Стрoганова А.М., Дранко С.Л., Насхлеташвили Д.Р., Лухменштейн А.В. Метилирование промотора гена MGMT как прогностический маркер глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии. 2025; 12(3): 70–77. [Botezatu I.V., Kondratova V.N., Stroganov A.M., Dranko S.L., Naskhletashvili D.R., Lichtenstein A.V. Methylation of MGMT promoter as a prognostic marker of glioblastoma. *Advances in Molecular Oncology.* 2025; 12(3): 70–77. (in Russian)]. doi: 10.17650/2313-805X-2025-12-3-70-77. EDN: MVJLUP.
3. Gulaia V., Shmelev M., Romanishin A., Shved N., Farniev V., Goncharov N., Biktimirov A., Vargas I.L., Khodosevich K., Kagansky A., Kumeiko V. Single-nucleus transcriptomics of IDH1- and TP53-mutant glioma stem cells displays diversified commitment on invasive cancer progenitors. *Sci Rep.* 2022; 12(1): 18975. doi: 10.1038/s41598-022-23646-3.
4. Antonica F., Santomaso L., Pernici D., Petrucci L., Aiello G., Cutarelli A., Conti L., Romanel A., Miele E., Tebaldi T., Tiberi L. A slow-cycling/quiescent cells subpopulation is involved in glioma invasiveness. *Nat Commun.* 2022; 13(1): 4767. doi: 10.1038/s41467-022-32448-0.
5. Ericas J.L., Bizama C., Niechi I., Uribe D., Rosales A., Fabres K., Navarro-Martinez G., Torres A., San Martin R., Roa J.C., Quezada-Monras C. Glioblastoma Microenvironment and Invasiveness: New Insights and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(8): 7047. doi: 10.3390/ijms24087047.
6. Adjei-Sowah E.A., O'Connor S.A., Veldhuizen J., Lo Cascio C., Plaisier C., Mehta S., Nikkha M. Investigating the Interactions of Glioma Stem Cells in the Perivascular Niche at Single-Cell Resolution using a Microfluidic Tumor Microenvironment Model. *Adv Sci (Weinh).* 2022; 9(21): e2201436. doi: 10.1002/advs.202201436.
7. Putavet D.A., de Keizer P.L.J. Residual Disease in Glioma Recurrence: A Dangerous Liaison with Senescence. *Cancers (Basel).* 2021; 13(7): 1560. doi: 10.3390/cancers13071560.
8. Masud N., Hasib M.H.H., Ibrinke B., Block C., Hughes J., Ekpenyong A., Sarkar A. Exploring the heterogeneity in glioblastoma cellular mechanics using in-vitro assays and atomic force microscopy. *Sci Rep.* 2025; 15(1): 19302. doi: 10.1038/s41598-025-04841-4.
9. Zhao W., Xie Q. Exosomal lncRNA-Mediated Intercellular Communication Promotes Glioblastoma Chemoresistance. *Cancer Immunol Res.* 2021; 9(12): 1372. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-21-0846.
10. Ellert-Miklaszewska A., Poleszak K., Pasierbinska M., Kaminska B. Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(3): 888. doi: 10.3390/ijms21030888.
11. Wang Z., Mo Y., Tan Y., Wen Z., Dai Z., Zhang H., Zhang X., Feng S., Liang X., Song T., Cheng Q. The ALDH Family Contributes to Immocyte Infiltration, Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transformation in Glioma. *Front Immunol.* 2022; 12:756606. doi: 10.3389/fimmu.2021.756606.
12. Malhotra J., Kim E.S. Oncolytic Viruses and Cancer Immunotherapy. *Curr Oncol Rep.* 2023; 25(1): 19–28. doi: 10.1007/s11912-022-01341-w.
13. Yang R., Hedberg J., Montagano J., Seals M., Puri S. Oncolytic Virus Therapies in Malignant Gliomas: Advances and Clinical Trials. *Cancers (Basel).* 2025; 17(19): 3180. doi: 10.3390/cancers17193180.
14. Faisal S.M., Castro M.G., Lowenstein P.R. Combined cytotoxic and immune-stimulatory gene therapy using Ad-TK and Ad-Ft3L: Translational developments from rodents to glioma patients. *Mol Ther.* 2023; 31(10): 2839–60. doi: 10.1016/j.mthe.2023.08.009.
15. Romanishin A., Vasilev A., Khasanshin E., Evtekhov A., Puzynin E., Rubina K., Kakotkin V., Agapov M., Semina E. Oncolytic viral therapy for gliomas: Advances in the mechanisms and approaches to delivery. *Virology.* 2024; 593: 110033. doi: 10.1016/j.virol.2024.110033.
16. Oishi T., Ito M., Koizumi S., Horikawa M., Yamamoto T., Yamagishi S., Yamasaki T., Sameshima T., Suzuki T., Sugimura H., Namba H., Kurozumi K. Efficacy of HSV-TK/GCV system suicide gene therapy using SHED expressing modified HSV-TK against lung cancer brain metastases. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2022; 26: 253–65. doi: 10.1016/j.omtm.2022.07.001.
17. Luo E.W., Liao M.L., Chien C.L. Neural differentiation of glioblastoma cell lines via a herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system driven by a glial fibrillary acidic protein promoter. *PLoS One.* 2021; 16(8): e0253008. doi: 10.1371/journal.pone.0253008.
18. Erickson N.J., Stavara M., Tekedereli I., Kaplitt M.G., Markert J.M. Herpes Simplex Oncolytic Viral Therapy for Malignant Glioma and Mechanisms of Delivery. *World Neurosurg.* 2025; 194: 123595. doi: 10.1016/j.wneu.2024.123595.
19. Liskovyykh M., Chuykin I., Ranjan A., Safina D., Popova E., Tolkunova E., Mosienko V., Minina J.M., Zhdanova N.S., Mullins J.J., Bader M., Alenina N., Tomilin A. Derivation, characterization, and stable transfection of induced pluripotent stem cells from Fischer344 rats. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27345. doi: 10.1371/journal.pone.0027345.
20. Coleman J.E., Huentelman M.J., Kasparov S., Metcalfe B.L., Paton J.F., Katovich M.J., Semple-Rowland S.L., Raizada M.K. Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo. *Physiol Genomics.* 2003; 12(3): 221–28. doi: 10.1152/physiolgenomics.00135.2002.
21. Koessinger A.L., Cloix C., Koessinger D., Heiland D.H., Bock F.J., Strathdee K., Kinch K., Martinez-Escardó L., Paul N.R., Nixon C., Malviya G., Jackson M.R., Campbell K.J., Stevenson K., Davis S., Elmasry Y., Ahmed A., O'Prey J., Ichim G., Schnell O., Stewart W., Blyth K., Ryan K.M., Chalmers A.J., Norman J.C., Tait S.W.G. Increased apoptotic sensitivity of glioblastoma enables therapeutic targeting by BH3-mimetics. *Cell Death Differ.* 2022; 29(10): 2089–104. doi: 10.1038/s41418-022-01001-3.
22. Fouquier J., Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect.* 2015; 3(3): e00149. doi: 10.1002/prp2.149.
23. Madhavan K., Balakrishnan I., Lakshmanachetty S., Pierce A., Sanford B., Fosmire S., Elajaili H.B., Walker F., Wang D., Nozik E.S., Mitra S.S., Dahl N.A., Vibhakar R., Venkataraman S. Venetoclax Cooperates with Ionizing Radiation to Attenuate Diffuse Midline Glioma Tumor Growth. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(11): 2409–24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-4002.
24. Rainov N.G., Fels C., Droegge J.W., Schäfer C., Kramm C.M., Chou T.C. Temozolomide enhances herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of malignant glioma. *Cancer Gene Therapy.* 2001; 8(9): 662–68.
25. Poon M.T.C., Bruce M., Simpson J.E., Hannan C.J., Brennan P.M. Temozolomide sensitivity of malignant glioma cell lines – a systematic review assessing consistencies between in vitro studies. *BMC Cancer.* 2021; 21(1): 1240. doi: 10.1186/s12885-021-08972-5.
26. Jezierzański M., Nafalska N., Stopyra M., Furgol T., Miciak M., Kabut J., Gisterek-Grocholska I. Temozolomide (TMZ) in the Treatment of Glioblastoma Multiforme-A Literature Review and Clinical Outcomes. *Curr Oncol.* 2024; 31(7): 3994–4002. doi: 10.3390/curroncol31070296.
27. Chen Q., Wang W., Chen S., Chen X., Lin Y. miR-29a sensitizes the response of glioma cells to temozolomide by modulating the P53/MDM2 feedback loop. *Cell Mol Biol Lett.* 2021; 26(1):21. doi: 10.1186/s11658-021-00266-9.
28. Voce D.J., Bernal G.M., Wu L., Crawley C.D., Zhang W., Mansour N.M., Cahill K.E., Szymura S.J., Uppal A., Raleigh D.R., Spretz R., Nunez L., Larsen G., Khodarev N.N., Weichselbaum R.R., Yamini B. Temozolomide Treatment Induces lncRNA MALAT1 in an NF-κB and p53 Codependent Manner in Glioblastoma. *Cancer Res.* 2019; 79(10): 2536–48. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2170.

29. Lansikh D., Kuziakova O., Baklanov I., Penkova A., Doroshenko V., Buriak I., Zhmenia V., Kumeiko V. Cell-Based Glioma Models for Anticancer Drug Screening: From Conventional Adherent Cell Cultures to Tumor-Specific Three-Dimensional Constructs. *Cells*. 2024; 13(24): 2085. doi: 10.3390/cells13242085.

30. Alomari O., Euvazova H., Güney B., Al Juhmani R., Odabasi H., Al-Rawabdeh L., Mokresh M.E., Erginoglu U., Keles A., Baskaya M.K. Oncolytic Therapies for Glioblastoma: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2025; 17(15): 2550. doi: 10.3390/cancers17152550.

31. Ageenko A., Vasileva N., Richter V., Kuligina E. Combination of Oncolytic Virotherapy with Different Antitumor Approaches against Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(4): 2042. doi: 10.3390/ijms25042042.

32. Fan J., Jiang H., Cheng L., Ma B., Liu R. Oncolytic herpes simplex virus and temozolomide synergistically inhibit breast cancer

cell tumorigenesis *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Lett*. 2021; 21(2): 99. doi: 10.3892/ol.2020.12360.

33. D'arrigo P., Dubois M., Sanchez Gil J., Lassence C., Hego A., Brouwers B., Lombard A., Rogister B., Neirinx V., Lebrun M., Sadzot-Delvaux C. An oncolytic herpesvirus expressing a CXCR4 antagonist interferes with glioblastoma cells' stemness features and migration. *Mol Ther Oncol*. 2025; 33(4): 201083. doi: 10.1016/j.omton.2025.201083.

34. Kim S., Jung B.K., Kim J., Jeon J.H., Kim M., Jang S.H., Kim C.S., Jang H. Anticancer effect of the oncolytic Newcastle disease virus harboring the PTEN gene on glioblastoma. *Oncol Lett*. 2024; 29(1): 6. doi: 10.3892/ol.2024.14752.

Поступила/Received 26.12.2025  
Одобрена после рецензирования/Revised 15.04.2026  
Принята к публикации/Accepted 21.04.2026

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Романишин Александр Олегович**, инженер-лаборант лаборатории трансляционных исследований, ОНК «Институт медицины и наук о жизни», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта» (г. Калининград, Россия). SPIN-код: 7775-3921. Author ID (Scopus): 57216789798. ORCID: 0000-0002-0583-443X.

**Васильев Александр Александрович**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории трансляционных исследований, ОНК «Институт медицины и наук о жизни», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта» (г. Калининград, Россия). Author ID (Scopus): 59117338100. ORCID: 0000-0001-9288-842X.

**Сысоева Вероника Юрьевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории морфогенеза и репарации тканей, факультет фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. Ломоносова» (г. Москва, Россия). SPIN-код: 9473-2564. Researcher ID (WOS): ABA-1184-2021. Author ID (Scopus): 6603150390. ORCID: 0000-0001-9885-9056.

**Рубина Ксения Андреевна**, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующая лабораторией морфогенеза и репарации тканей, факультет фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. Ломоносова» (г. Москва, Россия). SPIN-код: 9471-2511. Researcher ID (WOS): A-8208-2014. Author ID (Scopus): 7004199601. ORCID: 0000-0002-7166-7406.

**Семина Екатерина Владимировна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией трансляционных исследований, ОНК «Институт медицины и наук о жизни», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта» (г. Калининград, Россия); ведущий научный сотрудник лаборатории морфогенеза и репарации тканей, факультет фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. Ломоносова» (г. Москва, Россия). SPIN-код: 4586-4001. Researcher ID (WOS): A-8184-2014. Author ID (Scopus): 35081127300. ORCID: 0000-0002-3927-9286.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Романишин Александр Олегович**: разработка концепции и дизайна научной работы, сбор материала исследования, сбор и обработка данных, обработка результатов исследования, написание статьи, статистическая обработка данных.

**Васильев Александр Александрович**: обзор литературы, обработка результатов исследования, подготовка иллюстративного материала.

**Сысоева Вероника Юрьевна**: обработка результатов исследования, редактирование статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Рубина Ксения Андреевна**: обработка результатов исследования, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Семина Екатерина Владимировна**: общее руководство проектом, разработка концепции научной работы, обработка результатов исследования, написание статьи, редактирование статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

### Финансирование

Работа была выполнена при поддержке федеральной программы академического лидерства «Приоритет-2030» и Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 03р-23/110-03.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность д.б.н. А.Н. Томилину за предоставление плазмиды p2A2B-TKIRESPuro, содержащей последовательность ТК; д.б.н. Г.В. Павловой за предоставление клеточной линии U87-MG; к.б.н. А.Б. Яглович за предоставление клеточной линии U251-MG.

## ABOUT THE AUTHORS

**Alexander O. Romanishin**, Engineer, Laboratory of Translational Research, Institute of Medicine and Life Sciences, I. Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia). Author ID (Scopus): 57216789798. ORCID: 0000-0002-0583-443X.

**Alexander A. Vasilev**, PhD, Junior Researcher, Laboratory of Translational Research, Institute of Medicine and Life Sciences, I. Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia). Author ID (Scopus): 59117338100. ORCID: 0000-0001-9288-842X.

**Veronika Yu. Sysoeva**, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Mechanisms of Morphogenesis and Tissue Repair, Faculty of Fundamental Medicine, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): ABA-1184-2021. Author ID (Scopus): 6603150390. ORCID: 0000-0001-9885-9056.

**Ksenia A. Rubina**, DSc, Professor of Russian Academy of Science, Head of Laboratory of Mechanisms of Morphogenesis and Tissue Repair, Faculty of Fundamental Medicine, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): A-8208-2014. Author ID (Scopus): 7004199601. ORCID: 0000-0002-7166-7406.

**Ekaterina V. Semina**, DSc, Head of Laboratory of Translational Research, Institute of Medicine and Life Sciences, I. Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia); Leading Researcher, Laboratory of Mechanisms of Morphogenesis and Tissue Repair, Faculty of Fundamental Medicine, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): A-8184-2014. Author ID (Scopus): 35081127300. ORCID: 0000-0002-3927-9286.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Alexander O. Romanishin**: development of research design and concept, acquiring of research material, data collection and analysis, data processing, statistical analysis, writing the manuscript.

**Alexander A. Vasilev**: literature review, data processing, preparation of illustrations.

**Veronika Yu. Sysoeva**: data processing, editing the manuscript and adding valuable scientific insights.

**Ksenia A. Rubina**: data processing, editing the manuscript and adding valuable scientific insights.

**Ekaterina V. Semina**: project management, development of research design and concept, data processing, writing the manuscript, editing the manuscript and adding valuable scientific insights.

All authors approved the final version of the manuscript prior to publication and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved.

**Funding**

*This research was supported from the Russian Federal Academic Leadership Program Priority 2030 at the Immanuel Kant Baltic Federal University and by Russian Federation under the State Assignment No. 03r-23/110-03 of Lomonosov Moscow State University.*

**Conflict of interests**

*The authors declare that they have no conflict of interest.*

**Acknowledgments**

*The authors express their gratitude to A.N. Tomilin for providing the p2A2B-TKIRESPuro plasmid containing the TK sequence, G.V. Pavlova for providing the U87-MG cell line and A.B. Yaglovich for providing the U251-MG cell line.*