На правах рукописи

Назаренко Алина Сергеевна

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ АРБОВИРУСОВ НА МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ГЛИОБЛАСТОМЫ

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Научный руководитель:
Колясникова Надежда Михайловна – доктор медицинских наук.

Официальные оппоненты:

Рихтер Владимир Александрович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук.

Липатова Анастасия Валерьевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории пролиферации клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, город Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Филимонковский, поселок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита) и на сайте: http://www.chumakovs.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Аденокарцинома протоков поджелудочной железы (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) и глиобластома характеризуются крайне низкой пятилетней выживаемостью пациентов из-за недостаточной эффективности существующих методов лечения. Одним из факторов неблагоприятного прогноза для пациентов с PDAC и глиобластомой является их высокая иммуносупрессия. В этом отношении онколитические вирусы (ОВ) являются перспективным классом противоопухолевых агентов из-за их способности не только селективно инфицировать и лизировать опухолевые клетки, но и модулировать микроокружение опухоли, способствуя активации противоопухолевого иммунитета. На сегодняшний день для лечения глиобластомы существует зарегистрированный в Японии препарат Teserpaturev на основе вируса простого герпеса первого типа (ВПГ -1) - G47Δ, помимо этого, различные варианты аденовирусов, полиовируса, вируса везикулярного стоматита (ВВС) и других вирусов находятся на стадии доклинических и клинических испытаний для лечения глиобластомы и PDAC. В контексте онколитической терапии флавивирусы являются перспективными агентами из-за их высокой иммуногенности, удобного для модификации генома, безопасности некоторых вакцинных штаммов (например, штамм 17D вируса желтой лихорадки (ВЖЛ)) и способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, однако их противоопухолевые свойства мало изучены. Помимо поиска кандидатов в ОВ, важной фундаментальной задачей является изучение механизмов вирусного онколиза, и в этом аспекте также можно использовать представителей семейства флавивирусов, таких как ВЖЛ и вирус клещевого энцефалита (ВКЭ). Благодаря изучению их цитопатического действия (ЦПД) можно выявлять закономерности между литической активностью вируса, его генетическим профилем и молекулярно-генетическими характеристиками опухоли.

Однако, несмотря на уже имеющийся определенный успех применения ОВ, в качестве монотерапии они не способны привести к полному излечению пациента из-за гетерогенности опухолей и быстрой вирусной элиминации. Было показано, что комбинация ОВ с традиционными и новыми методами лечения (резекция опухоли, химиотерапия, адоптивная клеточная терапия и др.) значительно усиливает вирусный онколиз. Перспективным подходом является сочетание фотодинамической терапии (ФДТ) и онколитической виротерапии. В этом случае активные формы кислорода (АФК), генерируемые фотосенсибилизатором (ФС), облегчают проникновение вируса между плотными контактами опухолевых клеток, способствуют изменению микроопухолевого окружения и повреждению сосудистой сети опухоли. Однако на данный момент исследований по подобному подходу крайне мало.

Таким образом, изучение онколитических свойств представителей семейства флавивирусы, а также синергии ОВ с ФДТ является важной фундаментальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Ранее было показано, что ВКЭ ингибирует рост различных видов опухолей у мышей, таких как, нейробластома С1300, аденокарцинома молочной железы ЕО 771, саркомы MCI, Ридуэя, Т241 и 180 (A.E. Moore, 1949, 1951). Однако данные исследования относятся к 50-м годам прошлого века. Онколитическая активность ВЖЛ показана *in vivo* на моделях меланомы B16-OVA и карциномы толстой кишки MC38. Было установлено, что предварительная иммунизация мышей штаммом 17D ВЖЛ приводит к увеличению выживаемости животных (M.A. Aznar *et al*., 2020). Также исследовали рекомбинантный штамм 17D ВЖЛ с инсерцией гена цитотоксического эпитопа Т-лимфоцитов, полученного из куриного овальбумина, который вызывал регресс

метастазов меланомы мышей B16-OVA в легких (A. McAllister *et al.*, 2000). В сравнении с большим количеством исследований онколитических свойств других вирусов (ВПГ-1, аденовирусов, ВВС и др.) количество работ с изучением ВЖЛ и ВКЭ является незначительным.

Сочетание ФДТ с применением различных ОВ изучали в нескольких исследованиях. В одной из таких работ было обнаружено, что вызванное ФДТ повреждение сосудов опухоли привело к повышению титра вируса осповакцины в опухоли и ее инфильтрации нейтрофилами, что способствовало подавлению роста нейробластомы NXS2 (M. Gil *et al.*, 2011). В других исследованиях на клеточных линиях PDAC (PsPC-1 и BXPC-3) было показано, что синергия реовируса и ФДТ значительно усиливает цитотоксическое действие на опухолевые клетки в сравнении с монотерапией одним из методов (Y.S. Khaled *et al.*, 2015). Действие вируса болезни Ньюкасла с ФС способствует апоптозу клеток рака молочной железы 4T1к, что сопровождается повышением экспрессии IL-6, STAT3, NF-κB, TNF-α и инфильтрацией ксенотрансплантантов CD8+ Т-лимфоцитами (Y. Li *et al.*, 2025). Также применение рекомбинантного варианта ВПГ-1, кодирующего ФС, - G47Δ-KR показало усиление онколитического действия на животных моделях глиобластомы U-87 и менингомы IOMM-Lee (K. Shimizu *et al.*, 2023). Полученные результаты свидетельствуют о значительном потенциале совместного применения ФДТ и ОВ, однако исследования ограничены малой панелью клеточных линий, а также отсутствуют исследования сочетания ВВС и ФДТ.

Целью работы явилось изучение противоопухолевой активности арбовирусов (вируса желтой лихорадки и вируса клещевого энцефалита) в сравнении с другими онколитическими вирусами (вирусом везикулярного стоматита и полиовирусом 1 типа), оценка их потенциала для терапии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и глиобластомы, а также поиск подходов по усилению эффективности онковиротерапии.

Задачи исследования

1. Провести скрининг онколитической активности флавивирусов (штамм Софьин вируса клещевого энцефалита и штамм 17D вируса желтой лихорадки) в сравнении с другими онколитическими вирусами (штамм Индиана вируса везикулярного стоматита и штамм Сэбина полиовируса 1 типа) на опухолевых клетках различной этиологии.
2. Исследовать онкотропизм вакцинного штамма 17D вируса желтой лихорадки на клеточных линиях аденокарциномы протоков поджелудочной железы.
3. Изучить онколитический потенциал вакцинного штамма 17D вируса желтой лихорадки в отношении аденокарциномы протоков поджелудочной железы на сингенной модели Pan02 в иммунокомпетентных мышах.
4. Исследовать применимость вирусной терапии в сочетании с фотодинамической терапией для лечения глиобластомы, используя онколитический потенциал штамма Индиана вируса везикулярного стоматита и фототоксические свойства протопорфирина IX.

Научная новизна

В работе впервые проведена оценка чувствительности опухолевых клеточных линий к штамму 17D ВЖЛ и штамму Софьин ВКЭ. Были выявлены как преимущества, так и недостатки исследуемых вирусов в сравнении с другими широко известными ОВ (штамм Индиана ВВС и штамм Сэбина полиовируса 1 типа). Было установлено, что большинство исследуемых клеточных линий оказались не чувствительны или слабо чувствительны к ВКЭ, несмотря на способность вируса к репродукции в исследуемых опухолевых культурах. Впервые продемонстрировано, что ВЖЛ проявлял онколитическую активность на человеческие клеточные линии опухолей толстой кишки, молочной железы, аденокарциному легкого A549,

PDAC, нейробластому и астроцитому. Следует отметить, что клеточные линии глиобластомы человека продемонстрировали устойчивость к онколитическому действию как ВКЭ, так и ВЖЛ.

Впервые установлено, что ВЖЛ (штамм 17D) способен к репродукции, эффективному лизису или ингибированию роста опухолевых клеточных линий PDAC человека. Показано, что ВЖЛ способен к репродукции в мышиной клеточной линии Pan02, а также к ингибированию ее роста без видимого лизиса. На сингенной модели Pan02 впервые показано, что ВЖЛ обладает противоопухолевой активностью *in vivo*. Выдвинуто предположение, что положительный эффект от терапии ВЖЛ имеет иммуноопосредованный характер, на что косвенно указывают данные гистологического исследования и анализа крови, а также тот факт, что иммунизация с последующим введением вируса приводили к увеличению медианы выживаемости мышей.

В работе впервые исследована комбинированная терапия штаммом Индиана ВВС и ФДТ. Получен уникальный комплекс ВВС-протопорфирин IX, который продемонстрировал слабую онколитическую активность из-за ингибирующего действия ФС на вирусную репродукцию. Исходя из этого, был разработан протокол, предполагающий последовательное введение ФС и вируса с интервалом в 24 часа, что усилило эффекты комбинированной терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате скрининга онколитической активности штамма 17D ВЖЛ установлен его высокий потенциал как онколитического агента в отношении опухолей толстой кишки, молочной железы, аденокарциномы легкого, PDAC, нейробластомы и астроцитомы. При этом выявлено отсутствие эффективности в отношении глиобластомы, что ограничивает сферу его применения, но позволяет четко определить целевые нозологии для дальнейшей разработки терапевтических протоколов. Анализ онколитической активности штамма Софьин ВКЭ позволил выявить отсутствие или ограниченную онколитическую активность при активной репродукции вируса в большинстве исследуемых культур. В дальнейшем эти результаты могут стать основой для сравнительного анализа генетического профиля различных штаммов ВКЭ и их цитопатогенного действия, в результате чего можно выявить механизмы онколиза флавивирусов.

В результате изучения онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на клеточных линиях PDAC были выявлены разные эффекты на культурах: лизис, ингибирование роста или репродукция вируса без видимого ЦПД. Продемонстрированный противоопухолевый потенциал штамма 17D ВЖЛ на сингенной модели Pan02 позволяет отметить его как перспективный ОВ. Гипотеза об ингибировании роста опухоли иммуноопосредованным образом имеет особое значение, ведь в таком случае ВЖЛ способен активировать противоопухолевый иммунитет.

Изученная синергия ВВС и ФДТ позволяет сделать вывод о перспективности данного подхода для терапии глиобластомы. Несмотря на неэффективность полученного комплекса ВВС-протопорфирин IX, показано, что вирус способен сохранять инфекционность после взаимодействия с малыми молекулами, что делает возможным получение комплексов ВВС с другими малыми молекулами, которые обладают противоопухолевой активностью, но при этом не мешают репродукции вируса.

Методология и методы исследования

В рамках научной работы были использованы современные вирусологические, молекулярно-биологические гистологические, клинико-лабораторные и статистические методы исследования. Методы включали в себя культивирование различных опухолевых клеточных линий, 3D-сфероидов, вирусов и дальнейшую работу с ними, различные методы оценки клеточной жизнеспособности, оценку способности вирусов к проникновению в опухолевые клетки, исследования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), формирование

сингенной модели Pan02 и дальнейшую оценку противоопухолевой активности вирусов *in vivo*, клинический анализ крови животных, очистку вирусного материала, получение комплекса вируса с малыми молекулами. В ходе работы основными объектами исследования являлись арбовирусы - штамм 17D ВЖЛ, штамм Софьин ВКЭ и штамм Индиана ВВС.

Положения, выносимые на защиту

1. Вирус желтой лихорадки (штамм 17D) обладает онколитическим потенциалом в отношении опухолей толстой кишки, молочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, аденокарциномы легкого, астроцитомы и нейробластомы, в то время как вирус клещевого энцефалита (штамм Софьин) оказывает ограниченное онколитическое действие на данные клеточные линии за исключением опухолей толстой кишки.

2. Вирус желтой лихорадки (штамм 17D) способен к репродукции в клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы и ингибированию роста данных клеточных линий.

3. Внутриопухолевое введение вируса желтой лихорадки (штамм 17D) приводит к ингибированию роста аденокарциномы протоков поджелудочной железы мыши Pan02 у сингенных иммунокомпетентных мышей.

4. Последовательное введение вируса везикулярного стоматита (штамм Индиана) и фотосенсибилизатора протопорфирина IX усиливает эффекты комбинированной терапии в сравнении с монотерапией вирусом.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается проведением достаточного числа исследований с применением разных подходов, включающих различные молекулярно-биологические, вирусологические гистологические и клинико-лабораторные методы, при этом полученные данные были подвергнуты статистическому анализу. Результаты данной работы были представлены и обсуждены на следующих конференциях: конференция молодых ученых и специалистов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (Москва, 2022, 2023, 2024, 2025); международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2023, 2026); международная конференция, посвященная 300-летию РАН ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, 2023); XI Всероссийская молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, 2025); Саммит разработчиков лекарственных препаратов Сириус Биотех 2025 (Сочи, 2025).

Личное участие автора

В рамках подготовительного этапа диссертантом был осуществлён самостоятельный всесторонний анализ актуальных научных публикаций, включая как отечественные, так и зарубежные источники. Автор принимал непосредственное участие в реализации всех экспериментальных исследований и самостоятельно произвел анализ полученных данных. Все результаты исследования, представленные в работе, изложены и интерпретированы лично автором. Все научные статьи и презентационные материалы были либо разработаны непосредственно автором, либо созданы при его активном участии в процессе их подготовки.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 3, 5 и 6 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы (3 научные статьи и 1 научный обзор), в журналах из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК, а также изданиях, индексируемых в международных библиографических базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, PubMed. Публикации соответствуют требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертационного исследования.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 190 страницах и включает введение, главы обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа содержит 67 рисунков, 4 таблицы и 1 приложение. Список литературы содержит 214 источников, из которых 211 источников на английском языке и 3 источника на русском языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Оценка онколитического действия исследуемых флавивирусов *in vitro*

Поскольку онколитическая активность флавивирусов ВКЭ (штамм Софьин) и ВЖЛ (штамм 17D) практически не изучена, мы провели скрининг их противоопухолевой активности на панели перевиваемых клеточных культур опухолей мозга, поджелудочной железы, молочной железы, легких и толстой кишки с помощью методов МТТ-теста, ЦПД и ПЦР. Онколитическое действие исследуемых флавивирусов оценивали в сравнении с ВВС (штамм Индиана) и полиовирусом 1 типа (штамм Сэбина), противоопухолевые свойства которых хорошо изучены. Мы обнаружили, что онколитическое действие ВЖЛ сопоставимо с действием полиовируса на клеточные линии нейробластомы и карциному легкого А549 (Таблица 1). ВЖЛ также проявлял онколитическую активность на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы и опухолей толстой кишки человека, хотя его действие уступало ВВС и полиовирусу. Следует отметить, что противоопухолевая активность ВЖЛ коррелировала с интерфероновым статусом культуры, однако данная чувствительность была ниже, чем у ВВС, что, вероятно, связано со способностью ВЖЛ ингибировать путь JAK/STAT. ВКЭ не проявлял онколитического действия на большинстве исследуемых культур за исключением клеточных линий нейробластомы SH-SY5Y, карциномы легкого А549, опухолей толстой кишки HCT-116 и SW620, где его эффект был менее выражен или сопостовим с действием ВЖЛ, ВВС, и полиовирусом (Таблица 1). При этом ВКЭ был способен к репродукции во всех исследуемых культурах. Мы обнаружили отсутствие онколитического действия исследуемых флавивирусов в отношении карциномы толстой кишки мыши С26, что, вероятно, связано с чувствительностью ВЖЛ и ВКЭ к мышиному интерферону.

Таблица 1 – Исследование онколитического действия ВВС, полиовируса 1 типа, ВЖЛ и ВКЭ на опухолевые культуры

Клеточная линия	Интерфероновый статус	Вирус	MOI	МТТ-тест	ЦПД	ПЦР
Нейробластома Kelly	-	ВВС	0,001	6±2%	Не исследовали	
		Полиовирус	1	7±1%		
		ВЖЛ	1	41±9%	++	Рост количества РНК
		ВКЭ	1	76±9%		
Нейробластома SH-SY5Y	-	ВВС	0,001	0%	Не исследовали	
		Полиовирус	1	37±5%		
		ВЖЛ	1	6±6%	++++	Рост количества РНК
		ВКЭ	1	30±6%		

Продолжение таблицы 1

Клеточная линия	Интерфероновый статус	Вирус	MOI	MTT-тест	ЦПД	ПЦР
Астроцитома из послеоперационного материала	-	ВВС	0,001	43 ± 4%	Не исследовали	
		Полиовирус	1	11±3%		
		ВЖЛ	1	36 ± 10%		
		ВКЭ	1	69 ± 15%		
Карцинома легкого А549	Функциональный путь JAK/STAT, способность к индукции интерферона	ВВС	0,1	28±7%	Не исследовали	
		Полиовирус	1	0%		
		ВЖЛ	1	0%	++++	Рост количества РНК
		ВКЭ	1	36±12%		
Аденокарцинома молочной железы MCF7	Функциональный путь JAK/STAT, способность к индукции интерферона	ВВС	0,1	35±5%	Не исследовали	
		Полиовирус	1	0%		
		ВЖЛ	1	50±5%	+	Количество РНК без изменения
		ВКЭ	1	55±5%		Рост количества РНК
Аденокарцинома молочной железы MDA-MB-231	Нарушение передачи сигнала по JAK/STAT-пути	ВВС	0,1	0%	Не исследовали	
		Полиовирус	1	0%		
		ВЖЛ	1	30±15%	++	Рост количества РНК
		ВКЭ	1	100%	+	
Карцинома толстой кишки HCT-116	Функциональный путь JAK/STAT, низкая экспрессия интерферона 1 типа	ВВС	0,1	10±1%	Не исследовали	
		Полиовирус	1	18±3%		
		ВЖЛ	1	42±5%	+	Рост количества РНК
		ВКЭ	1	34±6%	++	
Аденокарцинома толстой кишки SW620	Функциональный путь JAK/STAT	ВВС	0,1	18±4%	Не исследовали	
		Полиовирус	1	31±3%		
		ВЖЛ	1	28±5%	++	Рост количества РНК
		ВКЭ	1	38±5%		
Карцинома толстой кишки мыши С-26	Функциональный путь JAK/STAT	ВВС	0,1	28±3%	Не исследовалось	
		Полиовирус	1	100%		
		ВЖЛ	1	100%	Отсутствие ЦПД	Количество РНК без изменения
		ВКЭ	1	100%	Не исследовали	

П р и м е ч а н и е - ЦПД оценивали на 4 креста (++++) если изменению (по сравнению с контролем) подвергся весь монослой в матрасе, если ¾ - на три (+++), если ½ - на два (++), если на ¼ - на один крест (+).

Мы также изучили онколитическую активность исследуемых флавивирусов на моделях глиобластомы и PDAC - основных объектах нашего исследования. По результатам MTT-теста было обнаружено, что в отношении культур глиобластомы человека GL6, LN-229, T98G и GMB (получена из послеоперационного материала) высокой онколитической активностью обладали полиовирус 1 типа и ВВС, в то время как ВЖЛ и ВКЭ не проявляли онколитическое действие (Рисунок 1). Исключением являлась культура GMB, где в результате действия ВКЭ мы наблюдали незначительное снижение выживаемости (до 20%). Клеточная линия глиомы мыши GL-261 оказалась чувствительна к ВВС и ВЖЛ, оставалась устойчивой к действию ВКЭ, а также к полиовирусу из-за отсутствия рецептора PVR (poliovirus receptor), который необходим полиовирусу для проникновения (Рисунок 1).

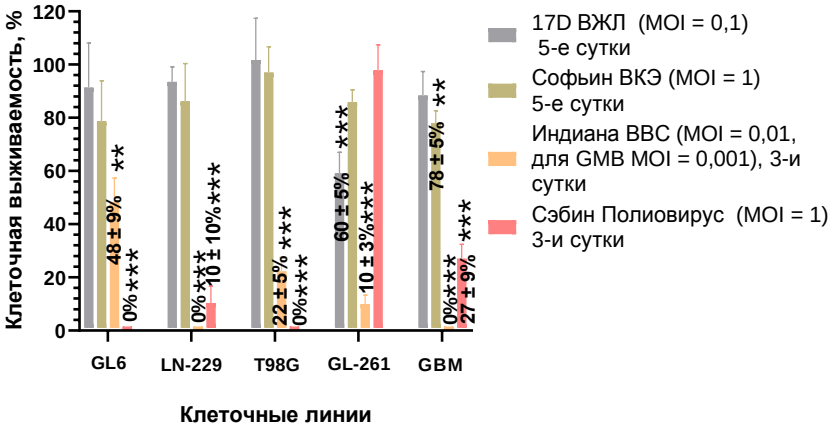


Рисунок 1 - Чувствительность клеточных культур глиобластомы человека и глиомы мыши к ВВС, полиовирусу 1 типа, ВЖЛ и ВКЭ по результатам МТТ-теста. Статистическая оценка проведена с использованием анализа one-way ANOVA (N=6). Действие вируса оценивали в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено)

Результаты МТТ-теста коррелировали с оценкой ЦПД для исследуемых флавивирусов. Мы наблюдали отсутствие ЦПД в результате действия ВЖЛ и ВКЭ для клеточных культур LN-229 и T98G. В случае культуры GL6 при инфицировании ВЖЛ мы наблюдали ЦПД, оцениваемое в 1 крест на третьи сутки эксперимента без последующего увеличения, а при действии ВКЭ ЦПД отсутствовало. По результатам ПЦР было выявлено снижение количества РНК ВЖЛ в культуральной жидкости для исследуемых культур глиобластомы (2-й опыт), что свидетельствовало об отсутствии вирусной репродукции (Таблица 2). Таким образом, ВЖЛ (штамм 17D) не проявляет онколитическую активность в отношении изученных клеточных линий глиобластомы человека. В случае ВКЭ мы обнаружили, что вирус репродуцируется в клеточных линиях LN-229 и GL6, о чем свидетельствуют результаты ПЦР-исследования культуральной жидкости, где в двух проведенных опытах наблюдался рост количества РНК ВКЭ. В клеточной культуре T98G РНК ВКЭ определялась на уровне и ниже уровня дозы заражения до конца эксперимента (Таблица 2). Таким образом, ВКЭ не оказывает литического эффекта в отношении исследованных культур глиобластомы, однако способен к репродукции в них.

Таблица 2 – Изменение количества РНК ВЖЛ и ВКЭ в культурах глиом по результатам ПЦР исследований

Вирус	Клеточные линии	Сутки / количество РНК (ГЭ/мл)					
		№ опыта	0	3	5	7	10
ВЖЛ	LN229	1	10^6	3×10^6	6×10^5	-	
		2		-	6×10^6	2×10^5	7×10^4
	GL6	1		10^6	7×10^6	-	
		2		-	10^6	5×10^5	10^5
	T98G	1		4×10^6	$1{,}5\times10^6$	-	
		2			4×10^6	10^5	6×10^4
	GL-261	1	$9*10^5$	$7*10^4$	$5*10^4$	$2*10^4$	$6*10^4$
ВКЭ	LN229	1	10^9	10^{11}	10^{11}	-	
		2		-	$1{,}5\times10^9$	3×10^{10}	7×10^{10}
	GL6	1		10^{11}	6×10^{10}	-	
		2		4×10^{10}	-	2×10^{10}	3×10^9
	T98G	1		2×10^9	2×10^9	-	
		2		-	10^7	2×10^7	4×10^7

П р и м е ч а н и е - Во втором эксперименте производили замену питательной среды (закрашенные ячейки)

На следующем этапе мы изучили онколитическую активность исследуемых вирусов на клеточных линиях PDAC человека PANC-1, MIAPaCa-2, Capan-2 и мыши Pan02. Известно, что из-за дефектных интерфероновых путей клеточная линия MIAPaCa-2 является

высокопермессивной для ОВ, за ней следует PANC-1 с высоким уровнем экспрессии IRF7 и низким уровнем экспрессии интерферона 1 типа, а культура Capan-2 является устойчивой к онколизу из-за интактной интерфероновой системы. Градация чувствительности данных клеточных линий к исследуемым вирусам соответствовала их интерфероновому статусу как по результатам МТТ-теста (Рисунок 2), так и при оценке ЦПД (ВКЭ и ВЖЛ), при этом ВКЭ продемонстрировал наименьшую онколитическую активность по сравнению с другими исследуемыми вирусами. В случае мышиной клеточной линии Pan02 онколитическое действие исследуемых флавивирусов на пятые сутки отсутствовало и лишь ВВС полностью лизировал клеточную культуру (Рисунок 2). Однако ВКЭ проявлял отсроченное ЦПД, которое обнаруживалось на 7-е сутки эксперимента. Мы наблюдали снижение выживаемости до 50%.

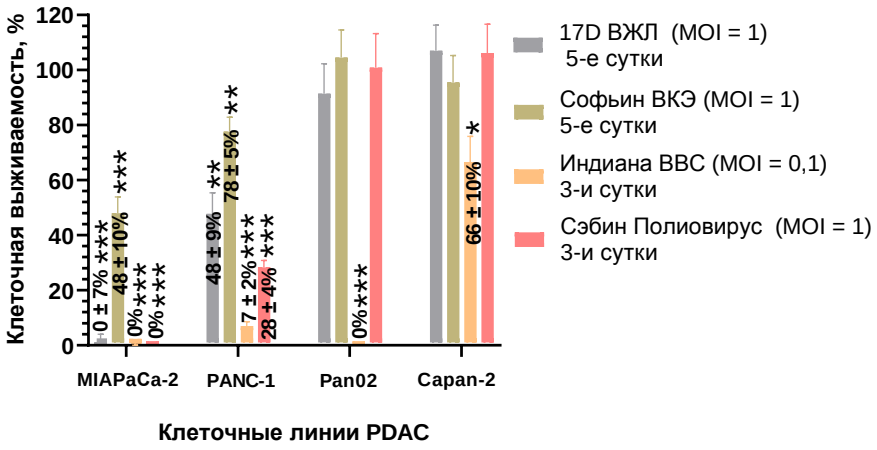


Рисунок 2 - Чувствительность клеточных линий PDAC MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-2, Pan02 к ВВС, полиовирусу 1 типа, ВЖЛ и ВКЭ по результатам МТТ-теста. Статистическая оценка проведена с использованием анализа one-way ANOVA (N=6)

По данным ПЦР мы обнаружили увеличение количества РНК ВЖЛ и ВКЭ в клеточных линиях MIAPaCa-2 и PANC-1, а в культуральной жидкости Capan-2 наблюдалось снижение РНК ВКЭ и сохранение РНК ВЖЛ на уровне дозы заражения до конца эксперимента, несмотря на замену питательной среды (Таблица 3). Количество РНК ВКЭ в мышиной клеточной линии Pan02 увеличилось на 3 порядка к седьмым суткам эксперимента (Таблица 3), что подчеркивает особенность штамма Софьин ВКЭ: вирус способен активно размножаться в клетках, не проявляя немедленного литического действия. Данные ПЦР для ВЖЛ будут представлены ниже.

Таблица 3 – Изменение количества РНК ВЖЛ и ВКЭ в культурах PDAC

Вирус	Клеточные линии	Сутки / количество РНК (ГЭ/мл)					
		№ опыта	0	3	5	7	10
ВЖЛ	MIAPaCa-2	1	10^6	2×10^8	2×10^8	-	
	PANC-1	1		10^8	6×10^7	-	
	Capan-2	1	$2{,}5*10^6$	6×10^5	10^6	-	
		2		6×10^6	6×10^6	6×10^5	2×10^6
ВКЭ	MIAPaCa-2	1	2×10^9	10^{11}	10^{11}	-	
	PANC-1	1		6×10^{10}	9×10^{10}	-	
	Capan-2	1	2×10^8	3×10^7	2×10^7	-	
	Pan02	1	2×10^9	2×10^{10}	2×10^{10}	-	
		2	10^9	10^{10}	2×10^{11}	10^{12}	-

П р и м е ч а н и е - Во втором эксперименте производили замену питательной среды (закрашенные ячейки)

Таким образом, результаты экспериментов показывают, что исследуемые флавивирусы оказывают онколитическое действие на клеточные линии PDAC человека. При этом отсутствие литического действия на клеточную линию Capan-2 не уменьшает перспективность использования флавивирусов из-за высокой резистентности данной клеточной линии к разным

онколитическим вирусам, таким как ВВС, полиовирус 1 типа, ВПГ-1, вирусам миксомы и болезни Ньюкасла, которые эффективно лизируют различные клеточные линии PDAC, но не Capan-2. Необходимо подчеркнуть, что штамм 17D ВЖЛ, по-видимому, способен к персистенции в Capan-2 на что указывают результаты ПЦР исследования. Учитывая высокую летальность PDAC и необходимость поиска новых противоопухолевых агентов, мы выбрали данную нозологию для дальнейшего изучения онколитического потенциала ВЖЛ (штамм 17D). Мы показали, что ВЖЛ обладает онколитической активностью в отношении культур PDAC. Кроме того, преимуществом ВЖЛ перед другими онколитическими вирусами является применение его в качестве вакцинного штамма 17D ВЖЛ, что значительно упрощает возможную клиническую разработку стратегий иммунотерапии, включающих внутриопухолевые инъекции данного ОВ. Также мы предполагаем, что иммуногенность ВЖЛ может играть положительную роль в терапии опухоли и приводить к ее лизису иммуноопосредованным образом.

2. Исследование онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на клеточные линии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы

Изначально мы решили подтвердить онколитическую активность ВЖЛ на PDAC с использованием современной системы прижизненного мониторинга клеточной пролиферации xCELLigence Real-TimeCell Proliferation Measurement (xCELLigence) (Agilent Technologies, США). В данной системе используется показатель клеточного индекса, который отражает уровень электрического сопротивления, создаваемого клетками. На клеточной линии MIAPaCa-2 было показано, что при MOI=1 ЦПД начинает проявляться через трое суток после заражения: инфицированные ВЖЛ клетки открепляются, что сопровождается снижением клеточного индекса, и к пятым суткам эксперимента живых клеток не остается (Рисунок 3).

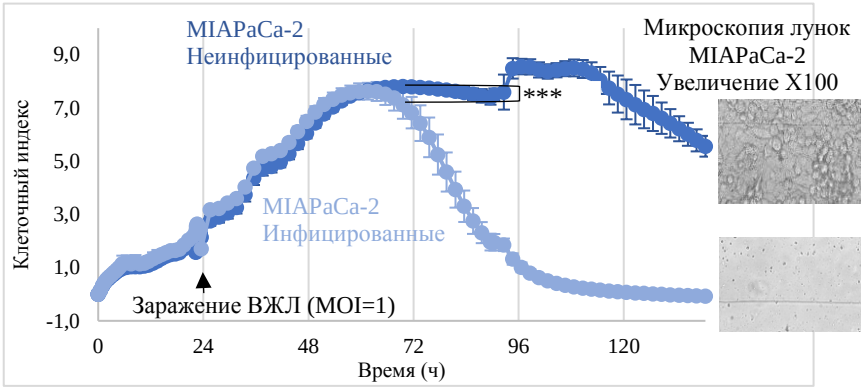


Рисунок 3 - Оценка онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на клеточную линию MIAPaCa-2 с помощью xCELLigence. Микроскопия клеток при 100-кратном увеличении. Статистическая оценка была проведена с использованием двустороннего t - критерия Стьюдента

Также мы провели оценку цитопатического эффекта ВЖЛ на опухолевых сфероидах, которые воспроизводят ключевые характеристики солидных опухолей. В ходе эксперимента мы использовали агарозные формы, и через трое суток культивирования формировались сфероиды MIAPaCa-2, размером около 650 мкм, которые инфицировали ВЖЛ в титре 10^6 БОЕ/мл. На третьи сутки эксперимента мы наблюдали разрыхление сфероидов, потерю их нативной структуры (Рисунок 4), что указывает на способность ВЖЛ проникать в толщу опухолевой массы и вызывать существенные структурные изменения в трёхмерных опухолевых моделях.

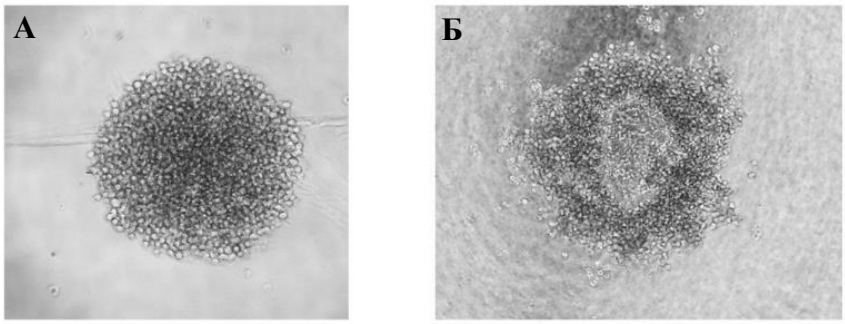


Рисунок 4 - Оценка онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на сфероидах MIAPaCa-2 на 3-и сутки эксперимента.
(А) Неинфицированный сфероид.
(Б) Инфицированный ВЖЛ сфероид

В отношении других клеточных линий PDAC ВЖЛ также проявлял ЦПД. С помощью системы xCELLigence было показано, что происходит подавление пролиферации человеческих клеточных линий MIAPaCa-2, PANC-1 и Capan-2 при высокой множественности заражения (MOI = 100). Однако в случае мышиной клеточной линии Pan02 ингибирование роста происходило не полностью (Рисунок 5).

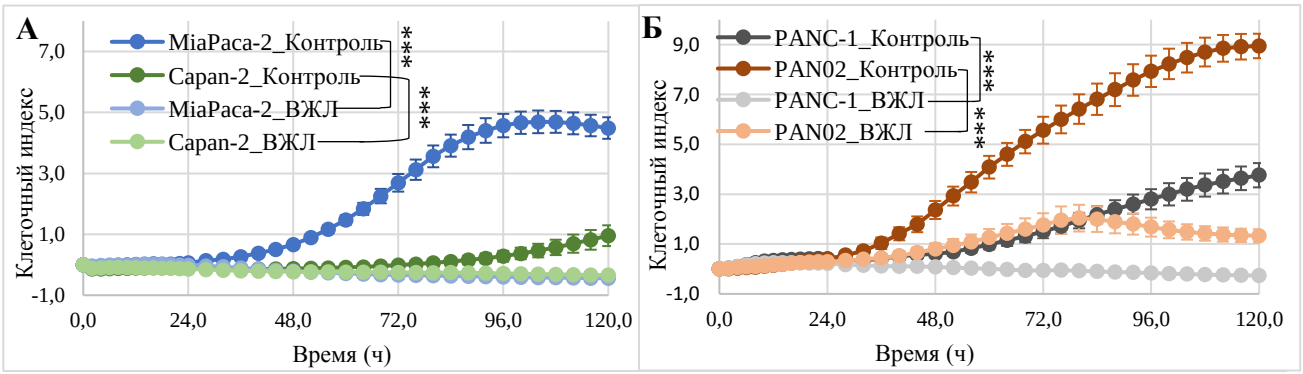


Рисунок 5 – Оценка онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на клеточные линии PDAC при MOI = 100: А) культуры MIAPaCa-2 и Capan-2, (Б) культуры PANC-1 и Pan02. Статистическая оценка была проведена с использованием двустороннего t - критерия Стьюдента

Таким образом, мы продемонстрировали онколитический потенциал ВЖЛ (штамм 17D) на клеточных линиях PDAC человека. Однако, для более полной оценки потенциала вируса необходимы эксперименты *in vivo*. Нами была выбрана мышиная клеточная линия Pan02, которая при имплантации мышам C57BL/6 формирует сингенную модель PDAC и является хорошей моделью для изучения онколитического действия и иммуноопосредованных механизмов терапии. Поскольку мы не обнаружили прямого литического действия ВЖЛ на культуру Pan02 для последующих экспериментов *in vivo* нам необходимо было подтвердить способность ВЖЛ к репродукции в данной клеточной линии. Для этого культуру Pan02 заражали ВЖЛ при MOI=0,1 и через трое суток производили пассаж клеток с целью изучения их пролифиративной активности с использованием системы xCELLigence (Рисунок 6). Исследование показало, что спустя 33 ч происходит ингибирование роста клеток Pan02, однако замена питательной среды приводила к исчезновению цитопатического эффекта и клетки продолжали пролифилировать аналогично контролю. Также мы заметили изменения морфологии у инфицированных клеток Pan02 через трое суток после заражения: клетки округлялись и имели аномальную форму, однако разрушения монослоя при этом не наблюдалось (Рисунок 7). Кроме того, в инфицированной культуре мы обнаружили $4{,}02*10^4$ мертвых клеток/мл, что было на порядок больше, чем в контрольной клеточной культуре ($5{,}74*10^3$ клеток/мл).

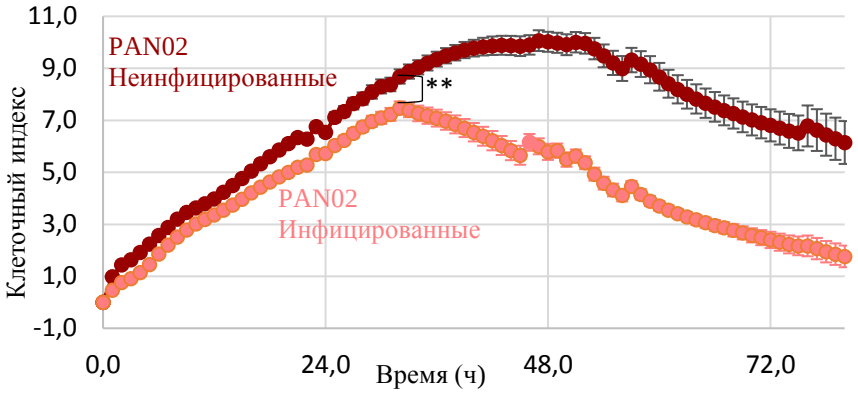


Рисунок 6 - Оценка онколитического действия ВЖЛ на клеточную линию Pan02 с помощью системы xCELLigence. Статистическая оценка была проведена с использованием двустороннего t - критерия Стьюдента

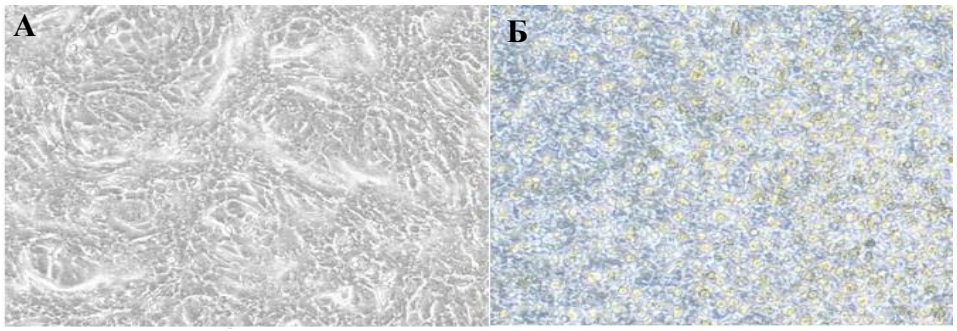


Рисунок 7 - Микроскопия клеток Pan02 через 3-е суток после заражения при увеличении х40. (А) Неинфицированные (контрольные клетки). (Б) Инфицированные ВЖЛ клетки

Также мы провели исследования методом ПЦР и оценили наличие инфекционного вируса в культуре Pan02 с помощью анализа бляшкообразующих единиц (БОЕ). Было показано, что вирусная РНК сохраняется примерно на уровне исходной дозы заражения (10^5 ГЭ/мл) даже после 13 суток культивирования ($5*10^4$ ГЭ/мл), несмотря на регулярную замену питательной среды (Таблица 4). Помимо этого, было обнаружено, что не только РНК ВЖЛ, но и сам инфекционный вирус сохранялись в клетках Pan02 даже после трёх последовательных пассажей (Таблица 5).

Таблица 4 - Изменение количества РНК ВЖЛ в культуральной среде и клетках при инфицировании клеточной линии Pan02

Опыт	Образец	Сутки					
		0	3	5	7	10	13
1	Культуральная жидкость, ГЭ/мл	10^6	$3*10^6$	$8*10^5$	Не исследовали		
2	Культуральная жидкость, ГЭ/мл	10^5	$7*10^{4}$**	Не исследовали	$3*10^5$	$6*10^4$	$5*10^4$
2	Клетки, ГЭ/мл	Не исследовали				$4*10^5$	$2*10^5$

П р и м е ч а н и е - Во втором эксперименте производили замену питательной среды (закрашенные ячейки)

Таблица 5 - Данные ПЦР в режиме реального времени и анализа БОЕ по персистенции РНК ВЖЛ в клетках Pan02 при инфицировании на 3-и сутки эксперимента и после 3-х пассажей

Метод исследования	Пассаж / Сутки				
	0 / 0	0 / 3	1 / 1	2 / 1	3 / 3
БОЕ, БОЕ/мл	$2,5*10^6$	$3*10^3$	$3*10^3$	10^3	$3*10^2$
ПЦР, ГЭ/мл	10^6	10^6	$4,5*10^5$	$2*10^5$	10^5

Чтобы подтвердить проникновение вируса в клетки, мы использовали липофильный мембранный трейсер DiD, флуоресценция которого усиливается при слиянии вирусного капсида с клеточной мембраной (видимая в канале Cy5). Клетки Pan02, MIAPaCa-2 и PANC-1 инфицировали ВЖЛ, меченным DiD, в то время как в качестве отрицательного контроля использовали инактивированный формалином вирус, также меченный DiD. Через 2 часа инкубации мы наблюдали флуоресцентные сигналы, указывающие на слияние клеточной и

вирусной мембран (Рисунок 8А). При этом интенсивность флуоресценции была ниже в клетках Pan02 по сравнению с клетками MIAPaCa-2 и PANC-1. При взаимодействии инактивированного вируса с культурами флуоресцентный сигнал практически отсутствовал (Рисунок 8Б).

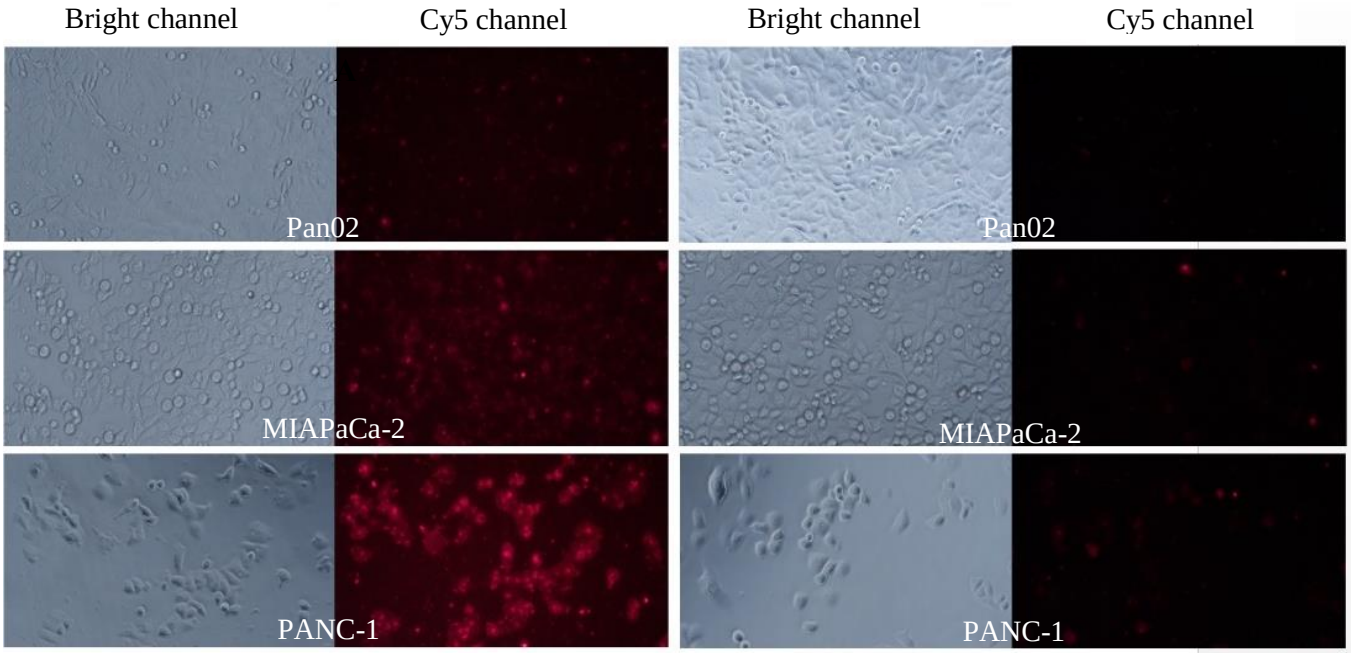


Рисунок 8 - Слияние клеточных мембран Pan02, MIAPaCa-2 и PANC-1 с ВЖЛ-DiD после 2-х часов инкубации. (А) Инфекционный вирус. (Б) Инактивированный формалином вирус. Микроскопия клеток при 200-кратном увеличении

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что ВЖЛ (штамм 17D) способен к персистенции в клеточной линии Pan02 и ингибированию ее роста. Репродукция вируса в опухолевой ткани может помочь преодолению иммуносупрессии, благодаря чему возможно ингибирование роста или деградация опухолевой массы иммуноопосредованным образом. Учитывая эти результаты, мы решили провести дальнейшие исследования для оценки иммуномодулирующего потенциала ВЖЛ на животной модели.

3. Исследование онколитического эффекта штамма 17D вируса желтой лихорадки на сингенной модели протоковой аденокарциномы поджелудочной железы Pan02

Для проведения экспериментов *in vivo* мы использовали мышей линии C57BL/6-SPF (SPF-виварий, ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ). Для формирования опухолей подкожно в правое бедро животным вводили $5{,}2\times10^5$ клеток Pan02 в 100 мкл PBS, и к десятому дню опухоли достигали размера 5-7 мм в диаметре. В этот момент 8 мышам (группа виротерапии) интратуморально вводили 10^6 БОЕ/100 мкл ВЖЛ, а 8 другим мышам (контрольная группа) вводили 100 мкл культуральной жидкости DMEM-VERO, полученной при культивировании клеток Vero. По достижении гуманной конечной точки мышей подвергали эвтаназии, проводили вскрытие, взятие образцов крови и опухолевых тканей. Терапия ВЖЛ привела к замедлению роста новообразования и увеличению выживаемости на 30% (медиана 30 дней) по сравнению с контрольной группой (медиана 23 дня) (Рисунок 9А). В группе с виротерапией у некоторых мышей в течение 7 дней после инъекции образовался отек в области опухоли, что затрудняло точное измерение размеров новообразования. Через 7-12 дней отек спадал, опухоли уплотнялись, и мы наблюдали замедленный рост опухолей по сравнению с контролем (Рисунок 9Б).

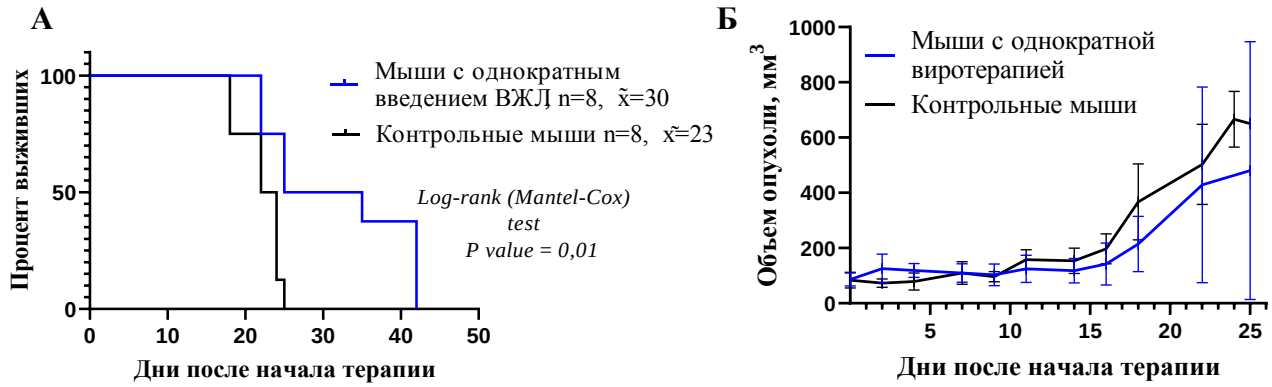


Рисунок 9 – (А) Анализ выживаемости Каплана-Майера с однократной виротерапией мышей штаммом 17D ВЖЛ. Полученные данные были статистически оценены методом Мантела-Кокса. (Б) График увеличения объема опухолей контрольных мышей и мышей с виротерапией ВЖЛ

Гистологическое исследование опухолей было проведено сотрудником ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России - д.м.н. Демяшкиным Григорием Александровичем. Анализ опухолей контрольных мышей показал, что паренхима аденокарциномы представлена плотно упакованными атипичными клетками, преимущественно эпителиоидного типа, где были видны фигуры митозов и гибель единичных клеток путём апоптоза (Рисунок 10). В группе с виротерапией опухоли были солидного строения с активной пролиферацией атипичных клеток, фокальными некрозами и диффузно расположенными лимфоцитами. Отчетливых прогрессирующих патоморфологических изменений не обнаружено. Таким образом, рост опухоли, вероятно усилился (Рисунок 10). Различий между двумя группами в лимфатических узлах не было, метастазы не обнаруживались.

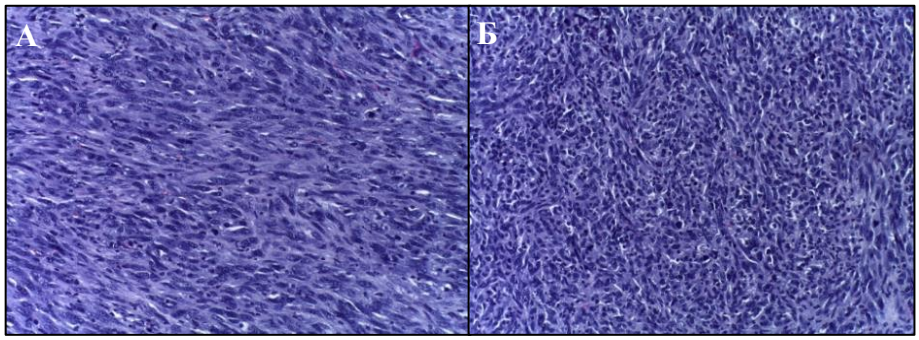


Рисунок 10 - Фрагмент аденокарциномы Pan02 на 25-й день от (А) контрольной мыши и (Б) мыши с виротерапией ВЖЛ.
Окрашено гематоксилином и эозином; увеличение ×200

Исследование показало неоднозначные результаты эффективности виротерапии. Хотя и наблюдалась положительная динамика в виде замедления роста новообразований, данные гистологического анализа лишь подтвердили усиление опухолевого роста. Поскольку в условиях *in vitro* мы также не наблюдали деградацию монослоя за счет действия только лишь вируса, мы предположили, что предварительная иммунизация мышей с последующим введением ВЖЛ поможет усилить инфильтрацию опухоли иммунными клетками и способствовать активации противоопухолевого иммунитета. Для проверки данной гипотезы перед введением опухолевых клеток мы иммунизировали мышей штаммом 17D ВЖЛ в дозе 10^6 БОЕ/100 мкл подкожной инъекцией в основание хвоста. Сыворотку у мышей брали на 14-й день после иммунизации, и в каждом образце были обнаружены нейтрализующие антитела к ВЖЛ. Через 4 дня после взятия сыворотки мышам имплантировали подкожно в правое бедро клетки Pan02, и далее проводили виротерапию по аналогии с неиммунизированными мышами. Терапия ВЖЛ оказала более выраженный положительный эффект на иммунизированных мышах и привела к увеличению их выживаемости на 56% (медиана выживаемости составила 36 дней против 23 в контрольной группе) (Рисунок 11А). Помимо этого, разница в росте опухолей у

иммунизированных и контрольных мышей к 25-м суткам эксперимента была более значительна, чем в случае терапии неиммунизированных мышей (Рисунок 11Б).

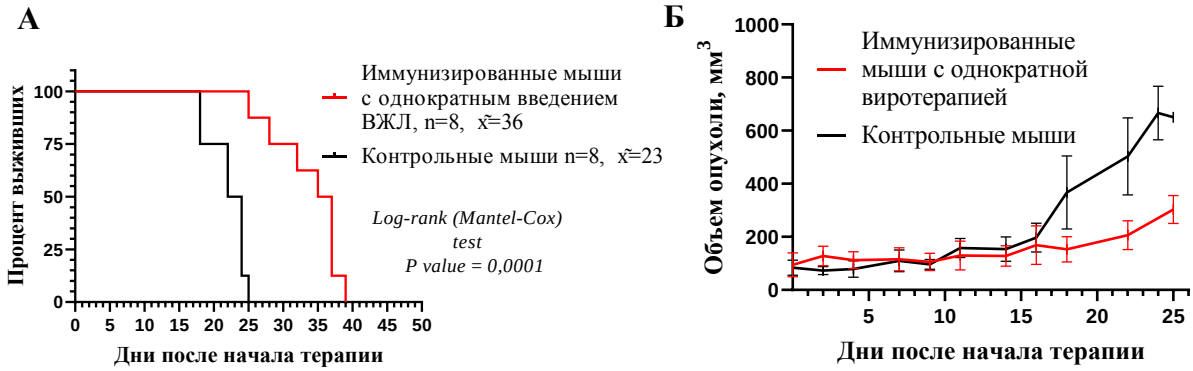


Рисунок 11 – (А) Анализ выживаемости Каплана-Майера иммунизированных мышей с однократной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. Полученные данные были статистически оценены методом Мантела-Кокса. (Б) Общий график роста опухолей контрольных мышей и иммунизированных мышей с виротерапией ВЖЛ

Гистологическое исследование опухолей мышей с виротерапей выявило умеренную воспалительную мононуклеарную инфильтрацию в паратуморальной зоне, а также очаги некроза и апоптоза атипичных клеток в паренхиме аденокарциномы (Рисунок 12). В контрольной группе подобных изменений не наблюдалось. Опухоли иммунизированных мышей с виротерапией имели преимущественно трабекулярно-фасцикулярную структуру, в отличие от солидных опухолей неиммунизированных мышей, получавших виротерапию. Состояние лимфатических узлов у мышей с терапией ВЖЛ не отличалось от мышей в контрольной группе.

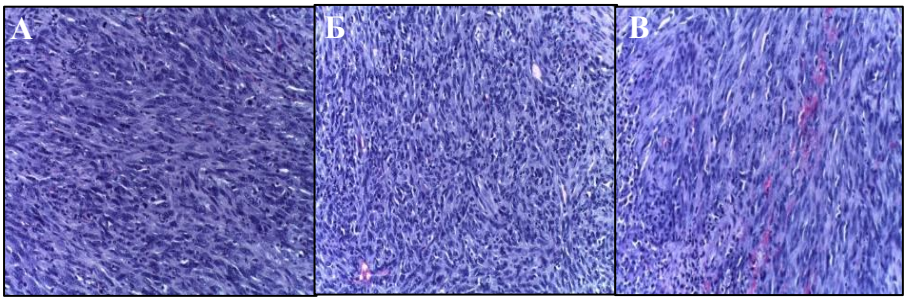


Рисунок 12 - Фрагменты аденокарциномы Pan02 с однократной виротерапией 17D ВЖЛ иммунизированных мышей. Увеличение ×200. (А) Контрольная мышь (25-й день). (Б) Мышь с виротерапией ВЖЛ (25-й день). (В) Мышь с виротерапией ВЖЛ (35-й день)

Результаты экспериментов показали, что предварительная иммунизация с последующей виротерапией обеспечивает более существенную задержку роста опухоли по сравнению с терапией неиммунизированных мышей. Помимо этого, в аденокарциноме с виротерапией присутствовали очаги гибели атипичных клеток, наблюдалось изменение структуры опухоли с солидного типа (неиммунизированные мыши) на трабекулярно-фасцикулярный тип, а также была обнаружена воспалительная мононуклеарная инфильтрация в паратуморальной зоне.

Следующим этапом нашего исследования стало изучение влияния многократного введения ВЖЛ. Эксперимент был проведен как на неиммунизированных, так и на иммунизированных мышах. Схема эксперимента была аналогична предыдущим за исключением того, что введение штамма 17D ВЖЛ проводилось трижды каждые 7 дней. По результатам эксперимента у неиммунизированных мышей трехкратное введение вируса увеличивало выживаемость лишь на 15% по сравнению с контрольной группой (медиана выживаемости составила 27 дней против 23 дней в контроле). Рост опухолей в экспериментальной группе к 25-му дню был немногим меньше, чем в контрольной группе (Рисунок 13Б). В группе иммунизированных мышей выживаемость была на 43% выше (медиана выживаемости составила

33 дня) по сравнению с контрольной группой (медиана 23 дня) (Рисунок 14А). Общий терапевтический эффект многократного введения вируса оказался менее выраженным как на иммунизированных, так и на неиммунизированных мышах по сравнению с однократной виротерапией (Рисунок 13А, 14А), где ингибирование роста новообразования было более значительным (Рисунок 13Б, 14Б). Следует отметить, что после введения третьей дозы у животных развился выраженный отёк в области сформированной опухоли, который затруднял измерения новообразования. Помимо этого, сразу после третьей инъекции штамма 17D ВЖЛ у мышей наблюдались токсические эффекты, а именно отсутствие двигательной активности и признаки боли, однако через сутки мыши приходили в нормальное состояние.

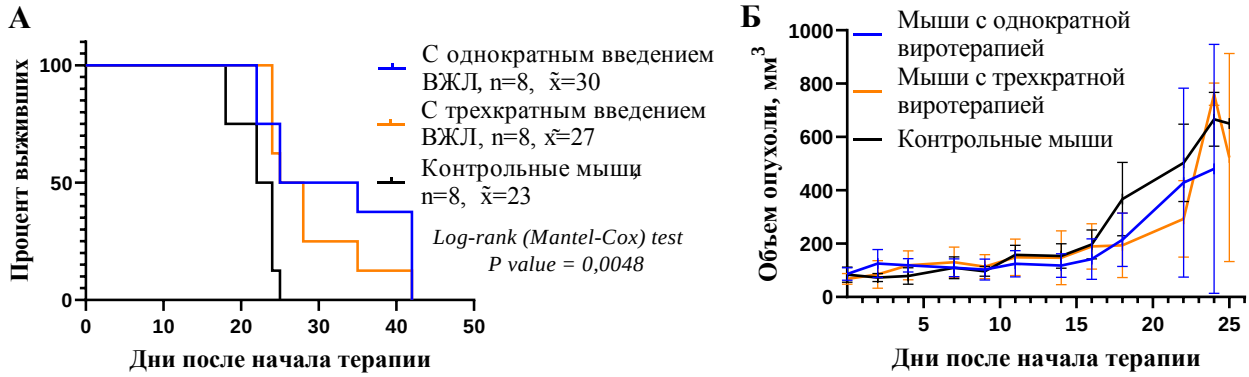


Рисунок 13 – Выживаемость неиммунизированных мышей с тройной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. (А) Анализ выживаемости Каплана-Майера. (Б) Общий график роста опухолей контрольных и неиммунизированных мышей. Полученные данные были статистически оценены методом Мантела-Кокса

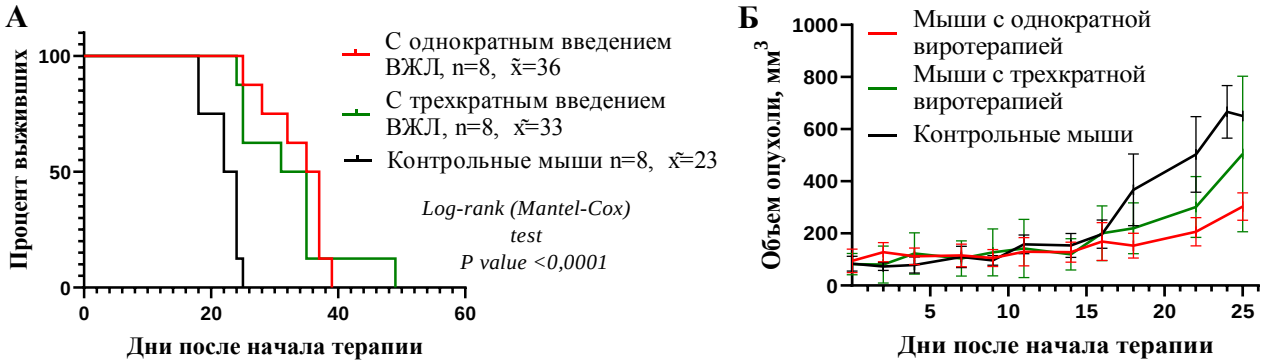


Рисунок 14 – Выживаемость иммунизированных мышей с тройной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. (А) Анализ выживаемости Каплана-Майера. (Б) Общий график роста опухолей контрольных и иммунизированных мышей. Полученные данные были статистически оценены методом Мантела-Кокса

Гистологический анализ показал, что у неиммунизированных и иммунизированных мышей с многократной виротерапией опухоли были преимущественно трабекулярно-фасцикулярного строения, в паратуморальной зоне присутствовала умеренная воспалительная мононуклеарная инфильтрация, опухоли содержали очаги некроза и был выявлен апоптоз атипичных клеток (Рисунок 15). У некоторых иммунизированных мышей была отмечена диффузная слабая мононуклеарная инфильтрация самой аденокарциномы. В опухолях мышей, выведенных в разные сутки, было отмечено снижение клеточной плотности и митотической активности, повышение гибели атипичных клеток (Рисунок 15), а также деструкция кровеносных сосудов. Лимфатические узлы мышей с виротерапией не отличались от контрольной группы.

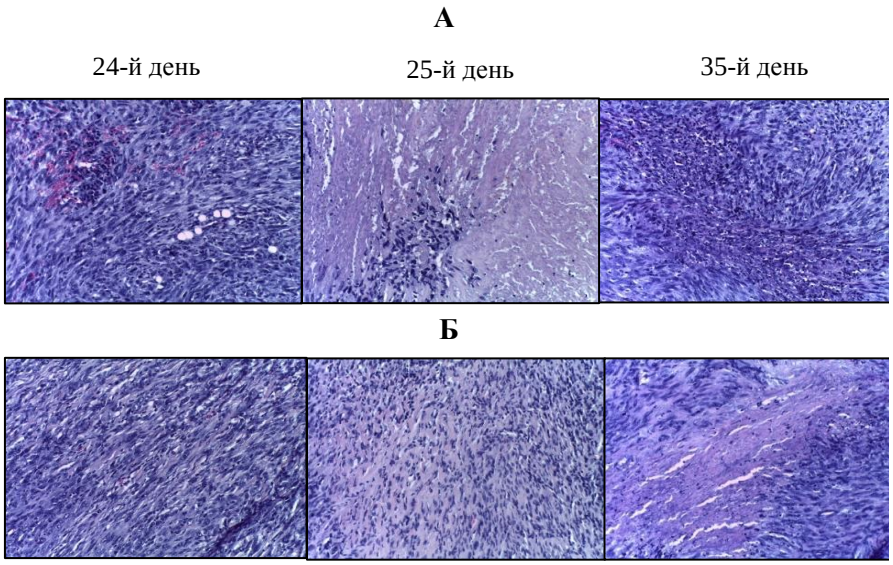


Рисунок 15 - Фрагмент аденокарцином Pan02 в группе неиммунизированных и иммунизированных мышей, выведенных из эксперимента на 24, 25 и 35-е дни, с трехкратной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. Увеличение ×200. (А) Неиммунизированные мыши. (Б) Иммунизированные мыши

Пять образцов опухолей и сывороток крови мышей с виротерапией были проанализированы на наличие РНК ВЖЛ методом ПЦР, получен отрицательный результат. Помимо этого, при контакте опухолевого экссудата с клетками Vero инфекционный вирус не был обнаружен. Это может указывать на быстрое выведение штамма 17D ВЖЛ после инъекции.

Несмотря на то, что в исследованиях с многократным введением вируса наблюдалось снижение выживаемости и токсические эффекты, нельзя признать терапию не эффективной, поскольку только в группе иммунизированных мышей с многократной виротерапией мы наблюдали инфильтрацию иммунными клетками самой аденокарциномы. Вероятно, более раннее достижение гуманной конечной точки у мышей было обусловлено не ростом опухоли, а развитием перитуморального отёка, вызванного инфильтрацией иммунными клетками. В любом случае необходимы дополнительные эксперименты с увеличением интервалов введения вируса.

Таким образом, наши исследования показывают, что штамм 17D ВЖЛ способен замедлять рост опухолей Pan02 предположительно иммуноопосредованным образом. Мы сделали такой вывод поскольку противоопухолевые эффекты ВЖЛ были сильнее у иммунизированных мышей, также у животных наблюдалась мононуклеарная инфильтрация в паратуморальной зоне и крупные очаги гибели клеток, в то время как у неиммунизированных мышей наблюдалась активная клеточная пролиферация и отсутствие инфильтрации иммунными клетками. Учитывая способность штамма 17D ВЖЛ лизировать клеточные линии PDAC человека, мы предполагаем, что синергия противоопухолевого иммунного ответа и прямое онколитическое действие вируса усилит эффекты терапии 17D ВЖЛ в условиях реальной опухоли.

4. Оценка действия комбинированной терапии вируса везикулярного стоматита с протопорфирином IX на глиобластому человека

Наряду с PDAC, в поиске эффективных методов лечения нуждается глиобластома — агрессивная опухоль головного мозга, характеризующаяся низкой выживаемостью пациентов. ВВС показал терапевтический потенциал для лечения данной нозологии, однако его применение ограничено высокой чувствительностью к интерферону, сложностью проникновения вглубь солидных опухолей и быстрой элиминацией из организма. Сочетание вирусной терапии с ФДТ может решить часть этих проблем. В рамках исследования в качестве ФС был использован протопорфирин IX, который нам предоставили коллеги из ФГБУН ИФХЭ РАН. Для проведения экспериментов были использованы две клеточные линии глиобластомы: T98G и LN-229.

С целью облегчения доставки ФС к опухолевым клеткам изначально был получен комплекс ВВС- протопорфирин IX. Для оценки способности ВВС взаимодействовать с малыми молекулами без потери своей инфекционности был использован флуоресцентный краситель Cyanine5.5, который смешивали с ВВС, после чего проводили очистку полученного комплекса ВВС-Cyanine5.5 от не прореагировавшего красителя. На следующем этапе получали комплекс ВВС-протопорфирин IX, используя аналогичный метод. Спектр флуоресценции комплекса ВВС-Cyanine5.5 в буфере PBS полностью соответствовал спектру флуоресценции чистого красителя Cyanine5.5 (Рисунок 16А). В спектре флуоресценции комплекса ВВС-протопорфирин IX наблюдался батохромный сдвиг на 14 нм, что связано с образованием связи между протопорфирином IX и ВВС или встраиванием протопорфирина IX в ВВС (Рисунок 16Б).

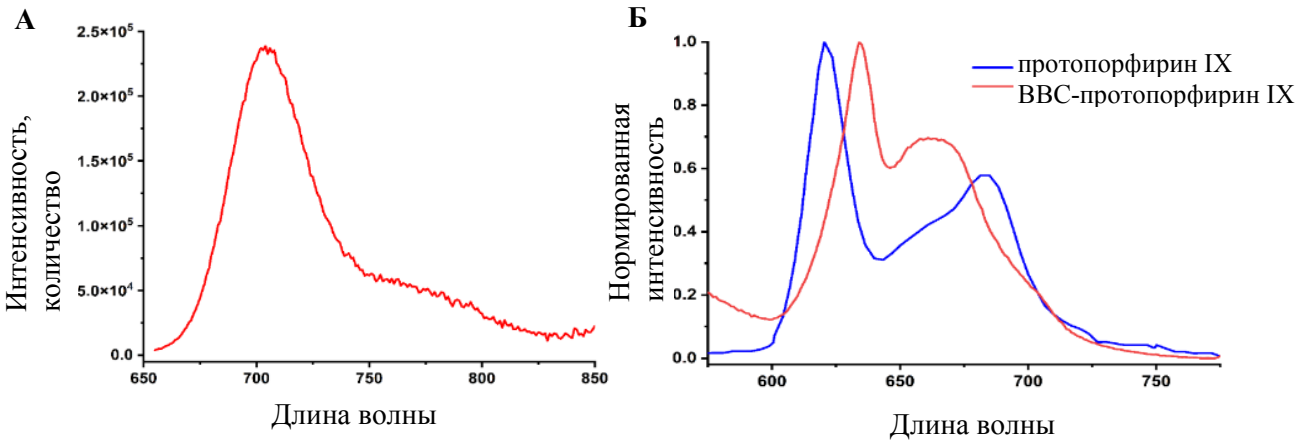


Рисунок 16 - Спектры флуоресценции (А) комплекса ВВС-Cyanine5.5 (возбуждение при 635 нм), (Б) комплекса ВВС-протопорфирин IX (возбуждение при 405 нм). Измерено в буфере PBS

Для оценки степени чистоты и инфекционности комплексов мы провели эксперимент с инфицированием клеточной линии Vero при плотности монослоя около 40%. Через час инкубации мы наблюдали адсорбцию ВВС-Cyanine5.5 и ВВС-протопорфирин IX на поверхности клеток (Рисунок 17). В качестве отрицательного контроля мы использовали Cyanine5.5 и протопорфирин IX, которые прошли те же этапы очистки, что и комплексы, и через час инкубации с культурой Vero мы не наблюдали флуоресцентного сигнала. Также при заражении комплексами монослоя культуры Vero через один и два дня мы наблюдали ЦПД, характерное для ВВС. Эти эксперименты подтвердили включение Cyanine5.5 и протопорфирина IX в ВВС и сохранение инфекционности комплексов. Однако титр вируса после всех манипуляций снизился на 5 и 8 порядков для комплексов ВВС-Cyanine5.5 и ВВС-протопорфирин IX соответственно, а также мы наблюдали токсические эффекты на клетки при действии комплекса ВВС-протопорфирин IX.

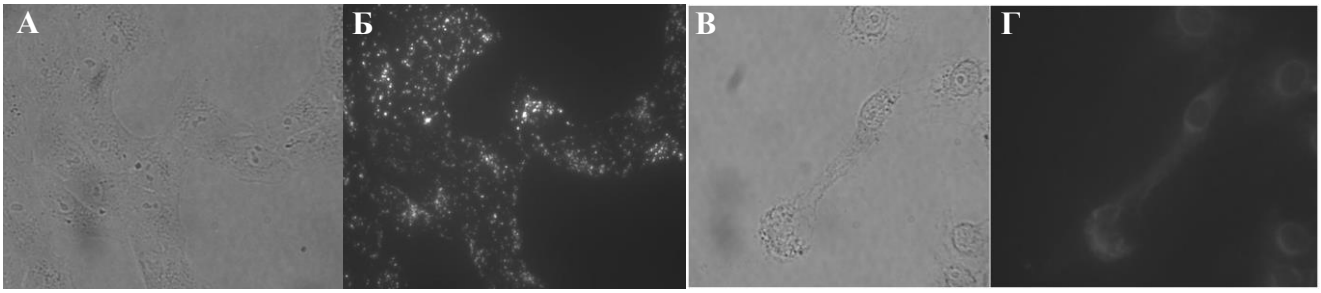


Рисунок 17 – Адсорбция комплексов на культуре Vero. (А) ВВС-Cyanine5.5 на канале BF. (Б) ВВС-Cyanine5.5 на канале Cy5. (В) ВВС-протопорфирин IX на канале BF. (Г) ВВС-протопорфирин IX на канале Cy5. Изображения получены с 40-кратным увеличением с помощью системы визуализации Celena X

Противоопухолевые свойства комплекса ВВС-протопорфирин IX были исследованы на глиобластоме T98G. Монослой клеток инфицировали комплексом ВВС-протопорфирин IX и облучали светом с длиной волны 450-480 нм. На следующий день наблюдалось разрушение монослоя, оцениваемое в 1-2 креста (Рисунок 18), при этом полной гибели клеток не наблюдалось. Слабый эффект от терапии вероятно связан с действием протопорфирина IX на вирус (инактивация путем встраивания в мембрану вируса и выделение АФК после облучения), в результате которого ВВС не смог репродуцироваться в клетках T98G, а также низкой концентрацией самого протопорфирина IX, из-за чего мы наблюдали лишь небольшое разрушение монослоя. Таким образом, стратегия создания комплекса вируса с протопорфирином IX не является эффективной.

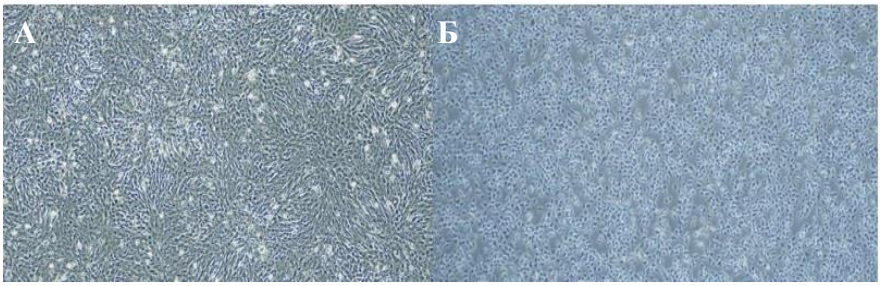
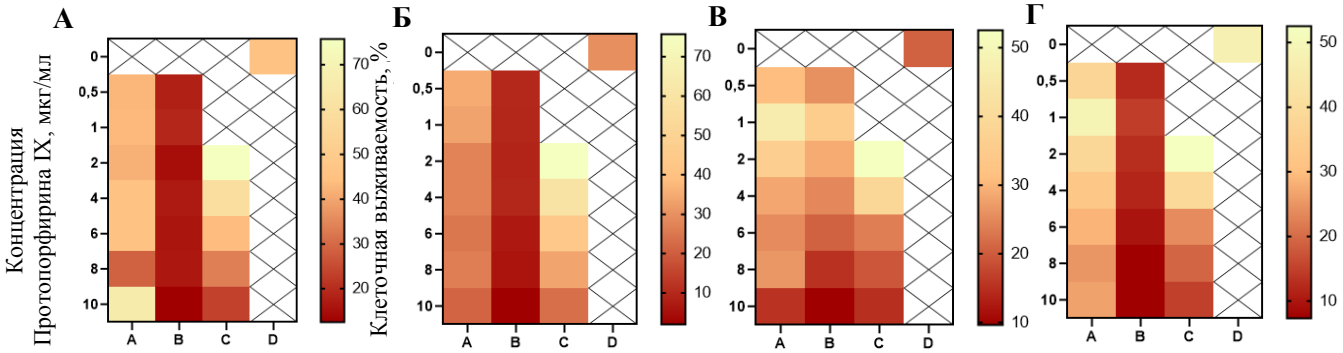


Рисунок 18 - Эффект от воздействия комплекса ВВС-протопорфирин IX на глиобластому T98G.
(А) Неинфицированная культура.
(Б) Инфицированная культура.
Увеличение ×4

Мы предположили, что для успешной комбинированной терапии ФДТ с онколитическим ВВС требуется последовательное введение ФС и вируса. Для этого изначально клетки T98G и LN-229 инкубировали с концентрациями протопорфирина IX в диапазоне от 0,5 до 10 мкг/мл в течение одного часа, после чего активировали ФС светом длиной волны 450 нм. Затем культуры обрабатывали ВВС при MOI = 0,0001 и 0,001 (10^3 и 10^4 $ЦПД_{50}$/мл) сразу после облучения или через сутки и через три дня оценивали жизнеспособность клеток. Действительно, в результате эксперимента было показано, что введение вируса через 24 часа после активации ФС усиливало эффекты комбинированной терапии по сравнению с монотерапией одним из методов или введением вируса сразу после активации ФС (Рисунок 19).



(A) ВВС добавлен сразу
(B) ВВС добавлен через 24 часа
(C) Действие только порфирина
(D) Действие только ВВС

(A) ВВС добавлен сразу
(B) ВВС добавлен через 24 часа
(C) Действие только порфирина
(D) Действие только ВВС

Рисунок 19 – Выживаемость клеточных линий глиобластомы (А) T98G при MOI = 0,001, (Б) T98G при MOI = 0,0001, (В) LN-229 при MOI = 0,001 и (Г) LN-229 при MOI = 0,0001 в результате синергии ФС и ВВС

В итоге мы подтвердили, что комбинированная терапия с добавлением вируса через сутки после ФС усиливает противоопухолевые эффекты. Особенно интересным явился тот факт, что отсроченное введение вируса позволяет снизить токсическое воздействие АФК, генерируемых протопорфирином IX, что связано с их исчезновением через сутки после активации ФС.

На следующем этапе мы оценили эффекты комбинированной терапии на многоклеточных опухолевых сфероидах T98G и LN-229. Изначально мы изучили эффекты монотерапии ВВС или ФС, для этого сфероиды были инфицированы ВВС в титре 10^5 $ЦПД_{50}$/мл или подвергались воздействию ФС при концентрации 10 мкг/мл и активации светом с длиной волны 450 нм и наблюдались в течение 5 дней. При действии ВВС у большинства сфероидов мы обнаружили глубокие структурные изменения и малое количество растущих клеток вокруг них, в то время как ФС не был способен к проникновению вглубь сфероидов и структурные изменения были поверхностными. В результате каждой монотерапии живые клетки обнаруживались и пролифилировали вокруг тумароида. При комбинированной терапии сфероиды инкубировали с протопорфирином IX при концентрации 10 мкг/мл с последующей активацией ФС, а затем добавляли вирус в титре 10^5 $ЦПД_{50}$/мл. В результате терапии значительной пролиферации клеток вокруг сфероидов обнаружено не было (Рисунок 20). Некоторые сфероиды отсоединялись и снова прикреплялись, аналогично тому, что мы наблюдали при монотерапии протопорфирином IX, затем наблюдались эффекты похожие на действие вируса: разрыхление, потеря нативной структуры сфероидов и отсутствие пролиферации клеток. К пятому дню живые клетки отсутствовали или имели аномальную форму

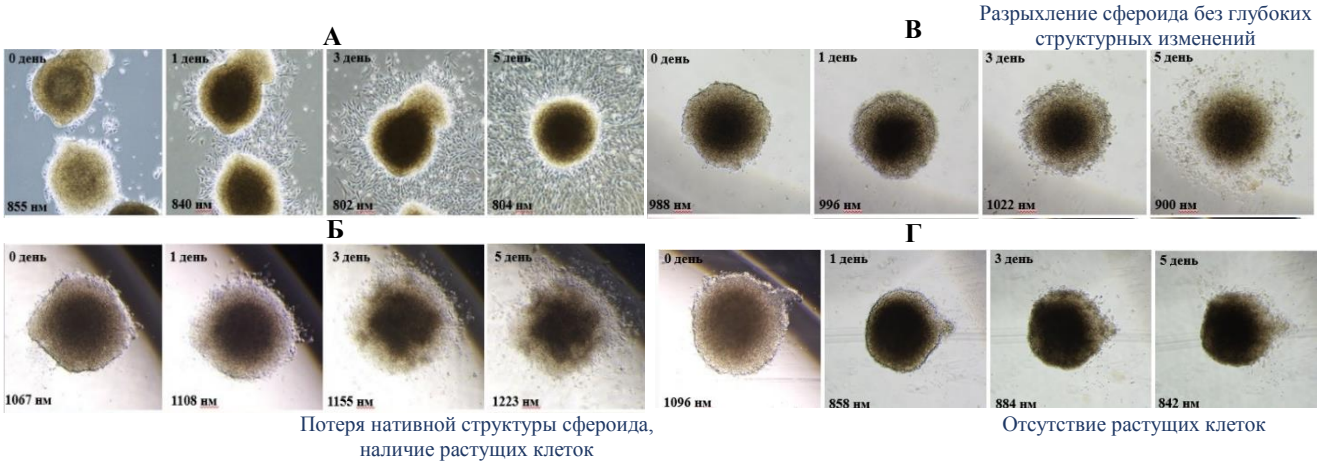


Рисунок 20 - Влияние ВВС на сфероиды T98G. (А) Неинфицированные сфероиды. (Б) Сфероиды, инфицированные ВВС. (В) Сфероиды, обработанные протопорфирином IX. (Г) Сфероиды, подвергшиеся комбинированной терапии. Увеличение ×4

Заключение

В рамках данной работы в первую очередь был проведен скрининг онколитической активности исследуемых флавивирусов (штамм 17D ВЖЛ и штамм Софьин ВКЭ) на панели клеточных линий различной этиологии. Было показано, что ВЖЛ проявляет онколитическую активность на человеческих клеточных линиях нейробластомы, опухолей толстой кишки, лёгкого, молочной железы и поджелудочной железы, что согласуется с данными других исследований, в которых штамм 17D ВЖЛ вызывал задержку роста карциномы толстой кишки MC38. Для штамма Софьин ВКЭ была выявлена характерная особенность: при активной вирусной репродукции зачастую наблюдается отсутствие ЦПД на опухолевые клетки, хотя ранее было показано, что штамм дальневосточного субтипа ВКЭ способен вызывать задержку роста нейробластомы мыши C1300 и аденокарциномы молочной железы мыши EO 771. Исследуемые флавивирусы не проявляли онколитическую активность на клеточные линии глиобластомы человека. Интересно, что другие флавивирусы - различные штаммы вируса Зика и штамм JEV-LAV вируса японского энцефалита, наоборот, продемонстрировали выраженный

онколитический эффект на клеточные линии глиобластомы *in vitro* и *in vivo*. Данный факт представляет интерес для дальнейшего изучения особенностей патогенеза флавивирусов.

После проведения скрининга онколитической активности ВЖЛ и ВКЭ было установлено, что ВЖЛ (штамм 17D) являтся перспективным онколитическим агентом в отношении PDAC. Преимуществом штамма 17D ВЖЛ является факт его широкого использования в качестве вакцины против желтой лихорадки, что упрощает возможную клиническую разработку стратегий, включающих внутриопухолевые инъекции. Было показано, что ВЖЛ способен подавлять пролиферацию культур PDAC человека, вызывать значительные структурные изменения в 3D-сфероидах MIAPaCa-2, а также репродуцироваться в мышиной культуре Pan02. Помимо этого, на сингенной модели Pan02 было обнаружено, что ВЖЛ потенциально обладает иммуноопосредованным механизмом действия и предварительная иммунизация животных усиливает противоопухолевые эффекты терапии. Вклад противоопухолевого иммунитета в ингибирование роста опухоли был подтвержден и ранее на модели меланомы B16-OVA и карциномы толстой кишки MC38, где иммунизация с последующим введением штамма 17D ВЖЛ приводила к увеличению медианы выживаемости. В нашем исследовании мы показали, что многократное введение вируса усиливает инфильтрацию опухоли иммунными клетками, хотя и снижает медиану выживаемости мышей, что требует оптимизации интервалов введения вируса.

На заключительном этапе работы была изучена комбинированная терапия ВВС с фотосенсибилизатором - протопорфирином IX. Был получен комплекс ВВС – протопорфирин IX, который продемонстрировал ограниченную эффективность из-за ингибирующего действия протопорфирина IX на ВВС. Однако при последовательном введении ФС и ВВС с интервалом в 24 часа удалось существенно повысить эффективность терапии. Также синергия ВВС и протопорфирина IX была продемонстрирована на 3D-сфероидах глиобластомы. Полученные результаты согласуются с рядом независимых исследований, однако в данных работах были использованы другие вирусы: вирус осповакцины, вирус болезни Ньюкасла, реовирус, ВПГ-1. Наши исследования и анализ данных других исследований демонстрируют перспективность такого подхода, тем не менее в последующем необходимо провести эксперименты *in vivo*.

Выводы

1. Показано, что человеческие клеточные линии нейробластомы (Kelly, SH-SY5Y), астроцитомы (полученной из послеоперационного материала от пациента), аденокарциномы молочной железы (MCF7, MDA-MB-231), опухолей толстой кишки (HCT-116, SW620), карциномы лёгкого (A549) проявляют значительную чувствительность к вирусу желтой лихорадки (штамм 17D), при этом наблюдается клеточная гибель более 50%. Клеточные линии аденокарциномы протоков поджелудочной железы проявляют разную чувствительность к вирусу желтой лихорадки (MIAPaCa-2 погибает полностью, PANC-1 погибает на 50%, а Capan-2 остается устойчивой). Мышиные клеточные линии C-26 и Pan02 остаются нечувствительными к прямому онколитическому действию вируса желтой лихорадки, а культура GL-261 проявляет слабую чувствительность к вирусу (наблюдается клеточная гибель менее 50%). Все клеточные линии глиобластомы человека (LN-229, T98G, GL6, полученной из послеоперационного материала) проявляют резистентность к действию вируса желтой лихорадки (штамм 17D).

2. Установлено слабое онколитическое действие вируса клещевого энцефалита (штамм Софьин) на клеточные линии глиобластомы (полученной из послеоперационного материала от пациента), нейробластомы (Kelly), астроцитомы (полученной из послеоперационного материала от пациента), аденокарциномы молочной железы (MCF7, MDA-MB-231), аденокарциномы протоков поджелудочной железы человека (MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-2), при этом отмечается

клеточная гибель менее 50%. Отсутствие онколитического действия наблюдается при действии вируса клещевого энцефалита на клеточные линии глиобластомы человека (LN-229, T98G и GL6). Высокочувствительными к действию вируса оказались только клеточные линии нейробластомы (SH-SY5Y), опухолей толстой кишки человека (HCT-116, SW620) и карциномы легкого (A549), при этом наблюдается клеточная гибель более 50%. Мышиные клеточные линии C-26 и GL-261 проявляют устойчивость к действию вируса клещевого энцефалита, и лишь культура Pan02 проявляет чувствительность к седьмым суткам после заражения (клеточная гибель 53±10%). Вирус клещевого энцефалита (штамм Софьин) способен к активной репродукции во всех исследуемых клеточных линиях.

3. Показано, что вирус желтой лихорадки (штамм 17D) подавляет пролиферацию аденокарциномы протоков поджелудочной железы человека (MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-2), а также разрушает 3D-сфероиды MIAPaCa-2.

4. Вирус желтой лихорадки (штамм 17D) способен к репродукции в мышиных клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы Pan02 и ингибированию их роста.

5. Вирус желтой лихорадки (штамм 17D) вызывает задержку роста опухоли Pan02 в иммунокомпетентных мышах, при этом предварительная иммунизация животных усиливает противоопухолевые эффекты. Многократная виротерапия усиливает инфильтрацию иммунными клетками опухоли, однако наблюдается снижение медианы выживаемости.

6. Показано, что фотодинамическая терапия совместно с вирусом везикулярного стоматита (штамм Индиана) усиливает цитотоксическое действие на клеточные линии и 3D-сфероиды глиобластомы человека (LN-229 и T98G), при этом наиболее эффективным является введение вируса везикулярного стоматита через 24 часа после протопорфирина IX.

Практические рекомендации

1. Проведенный скрининг онколитической активности вируса желтой лихорадки (штамм 17D) и вируса клещевого энцефалита (штамм Софьин) может быть использован для дальнейшего изучения механизмов вирусного онколиза.

2. Выявленное онколитическое действие вируса желтой лихорадки (штамм 17D) в отношении клеточных линий аденокарциномы протоков поджелудочной железы и многолетний опыт клинического применения штамма 17D вируса желтой лихорадки в качестве живой аттенуированной вакцины против желтой лихорадки позволяют рассматривать данный вирус в качестве кандидата в онколитические вирусы для терапии аденокарциномы протоков поджелудочной железы.

3. Стратегия введения онколитического вируса и фотосенсибилизатора с временным интервалом в 24 часа может рассматриваться в качестве подхода при лечении глиобластомы.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В перспективе предстоящих исследований важной задачей является изучить онколитическую активность разных штаммов вируса клещевого энцефалита для выявления взаимосвязи между литической активностью вируса, его генетическим профилем и молекулярно-биологическими характеристиками опухолевых клеток.

Еще одним важным направлением исследования является продолжение изучения онколитического действия вируса желтой лихорадки (штамм 17D) на клеточные линии аденокарциномы протоков поджелудочной железы. Планируется расширить панель клеточных линий с интактными интерфероновыми путями и изучить на них онколитическое действие вируса желтой лихорадки (штамм 17D), исходя из полученных данных выявить некоторые

механизмы вирусного онколиза. Также в экспериментах *in vivo* предполагается оптимизировать интервалы введения вируса при многократной терапии для снижения токсических эффектов, помимо этого необходимо изучить профиль иммунных клеток, которыми инфильтрируется опухоль при виротерапии. Также еще одной задачей будет проведение комбинированной терапии вирусом желтой лихорадки (штамм 17D) с другими методами лечения.

Не менее важным направлением исследований остается изучение комбинированного действия фотосенсибилизатора с вирусом везикулярного стоматита (штамм Индиана), в частности дальнейшая оценка эффектов комбинированной терапии на мышиной клеточной линии глиомы GL-261 с последующим переходом к исследованию комбинированной терапии на животной модели. Помимо этого, перспективным является получение функциональных комплексов вируса везикулярного стоматита с другими малыми молекулами, противоопухолевые свойства которых не связаны с выделением активных форм кислорода.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Nazarenko, A.S**., Biryukova, Y.K., Trachuk, K.N., Orlova, E.A., Vorovitch, M.F., Pestov, N.B., Barlev, N.A., Levaniuk, A.I., Gordeychuk, I.V., Lunin, A.S., Demyashkin, G. A., Shegai, P. V., Kaprin, A. D., Ishmukhametov, A. A., Kolyasnikova, N. M. / Immunotherapeutic Potential of the Yellow Fever Virus Vaccine Strain 17D for Intratumoral Therapy in a Murine Model of Pancreatic Cancer // Vaccines – 2025. – V. 13. – № 1.– P. 40. DOI: 10.3390/vaccines13010040 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q2). 1,375/0,092 п.л.

2. **Nazarenko, A.S**., Shkirdova, A.O., Orlova, E.A., Biryukova, Y.K., Vorovitch, M.F., Kolyasnikova, N.M., Ishmukhametov, A.A., Tyurin, V.S.; Zamilatskov, I.A. / Viral-Porphyrin Combo: Photodynamic and Oncolytic Viral Therapy for Potent Glioblastoma Treatment. // International Journal of Molecular Sciences – 2024. – № 25 – P. 12578. DOI: 10.3390/ijms252312578 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q1). 1,375/0,153 п.л.

3. **Назаренко А.С**., Бирюкова Ю.К., Орлова Е.О., Трачук К.Н., Иванова А.Л., Белякова А.В., Пестов Н.Б., Ворович М.Ф., Ишмухаметов А.А., Колясникова Н.М. / Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов желтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластом и карцином поджелудочной железы // Вопросы вирусологии. – 2023. – Т. 68. – №6. – С. 536-548. DOI: 10.36233/0507-4088-204 (RSCI, Scopus, PubMed, перечень ВАК, К1). 0,813/0,081п.л.

4. **Nazarenko, A.S**., Vorovitch, M.F., Biryukova, Y.K., Pestov, N.B., Orlova, E.A., Barlev, N.A., Kolyasnikova, N.M., Ishmukhametov, A.A. / Flaviviruses in AntiTumor Therapy // Viruses – 2023. – №15 – P.1973. DOI: 10.3390/v15101973 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q2). 1,000/0,125 п.л.