

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(Институт полиомиелита)

На правах рукописи

НАЗАРЕНКО

Алина Сергеевна

**ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ АРБОВИРУСОВ НА
МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И
ГЛИОБЛАСТОМЫ**

1.5.10. Вирусология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Колясникова Надежда Михайловна

Москва – 2026

Оглавление

Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	18
1.1 Характеристика семейства <i>Flaviviridae</i>	19
1.1.1 Описание и жизненный цикл.....	19
1.1.2 Онколитические свойства флавивирусов	21
1.1.2.1 Вирус Зика	23
1.1.2.2 Вирус желтой лихорадки	25
1.1.2.3 Вирус Западного Нила.....	26
1.1.2.4 Вирус японского энцефалита.....	28
1.1.2.5 Вирус денге.....	29
1.2 Характеристика семейства <i>Rhabdoviridae</i>	30
1.2.1 Описание и жизненный цикл.....	30
1.2.2 Онколитические свойства вируса везикулярного стоматита	33
1.2.2.1 Штамм VSV-IFN β	34
1.2.2.2 Штаммы rM51R-M и rVSV- Δ M51	35
1.2.2.3 Штамм VSV-GP.....	36
1.2.3 Механизмы резистентности опухолей к вирусу везикулярного стоматита.....	37
1.2.4 Стратегии усиления онколитической терапии вируса везикулярного стоматита.....	39
1.2.4.1 Стратегии использования интерферона	39
1.2.4.2 Неклассические рекомбинанты вируса везикулярного стоматита.....	40
1.2.4.3 Противоопухолевые вакцины на основе вируса везикулярного стоматита.....	41

1.2.4.4	Терапия с ингибиторами гистондеацетилаз	42
1.2.4.5	Терапия с ингибиторами иммунных контрольных точек	43
1.2.4.6	Совместное применение с химиотерапией или лучевой терапией	44
1.2.4.7	Терапия с другими онколитическими вирусами	45
1.3	Характеристика семейства <i>Picornaviridae</i>	46
1.3.1	Описание и жизненный цикл	46
1.3.2	Онколитические свойства полиовируса	48
1.4	Характеристика протоковой аденокарциномы поджелудочной железы ..	51
1.5	Характеристика глиобластомы	53
Глава 2.	Материалы и методы	56
2.1	Материалы, использованные в работе	56
2.1.1	Реактивы	56
2.1.2	Питательные среды	56
2.1.3	Клеточные линии	57
2.1.4	Вирусы	57
2.1.5	Лабораторные животные	58
2.2	Культивирование клеточных линий и вирусов	58
2.2.1	Хранение и культивирование клеточных линий	58
2.2.2	Получение 3D-тканевых сфероидов	59
2.2.3	Получение перививаемых культур астроцитомы	59
2.2.4	Хранение и культивирование вирусов	60
2.3	Титрование вирусов	60
2.3.1	Титрование вирусов по методу Рида-Менча	60
2.3.2	Титрование вирусов методом бляшкообразования	61

2.4	Определение чувствительности клеточных линий к вирусам.....	62
2.4.1	Оценка жизнеспособности клеток по цитопатогенному действию....	62
2.4.2	Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ-теста	63
2.4.3	Оценка вирусного цитопатогенного действия на 3D-тканевых сфероидсах.....	63
2.4.4	Микроскопия	64
2.4.5	Использование системы прижизненного мониторинга клеточной пролиферации xCELLigence Real-Time Cell Proliferation Measurement	64
2.4.6	Анализ слияния вируса желтой лихорадки с клетками опухолевых линий PANC-1, MIAPaCa-2 и Pan02	65
2.4.7	Заражение опухолевым экссудатом клеточной линии Vero.....	66
2.5	Определение РНК вирусов методом ПЦР в режиме реального времени	66
2.5.1	Сбор и хранение материалов для ПЦР	66
2.5.2	Выделение РНК / получение кДНК	67
2.5.3	Определение РНК вирусов методом ПЦР в режиме реального времени.....	67
2.6	Оценка чувствительности клеточных линий глиобластомы человека к протопорфиру IX и вирусу везикулярного стоматита	68
2.6.1	Оценка чувствительности клеточных линий глиобластомы человека к протопорфиру IX	68
2.6.2	Оценка чувствительности клеточных 3D-тканевых сфероидов глиобластомы человека к протопорфиру IX.....	68
2.6.3	Оценка чувствительности клеточных линий глиобластомы человека к комбинированной обработке протопорфирином IX и вирусом везикулярного стоматита	69
2.6.4	Оценка чувствительности 3D-тканевых сфероидов к комбинированной обработке протопорфирином IX и вирусом везикулярного стоматита	69

2.7	Методы получения комплексов вируса везикулярного стоматита	70
2.7.1	Осветление и концентрирование штамма Индиана вируса везикулярного стоматита	70
2.7.2	Получение комплекса BBC-Cyanine5.5	70
2.7.3	Получение комплекса BBC-протопорфирин IX	71
2.7.4	Флуоресцентная микроскопия.....	71
2.7.5	Определение чувствительности культуры T98G к комплексу BBC-протопорфирин IX	71
2.8	Определение противоопухолевой активности штамма 17D вируса желтой лихорадки на сингенной модели Pan02	72
2.8.1	Иммунизация мышей C57BL/6 штаммом 17D вируса желтой лихорадки	73
2.8.2	Забор крови у мышей C57BL/6.....	73
2.8.3	Формирование сингенной модели Pan02 в мышах C57BL/6	73
2.8.4	Виротерапия опухолей Pan02 штаммом 17D вируса желтой лихорадки.....	74
2.9	Исследование крови мышей с опухолями Pan02	75
2.9.1	Анализ гематологических показателей	75
2.9.2	Реакция нейтрализации	75
2.10	Статистический анализ.....	76
Глава 3.	Результаты и их обсуждение.....	77
3.1	Оценка онколитического действия исследуемых флавивирусов <i>in vitro</i>	77
3.1.1	Оценка онколитического действия флавивирусов на модели опухолей мозга	78
3.1.1.1	Клеточные линии глиомы	78
3.1.1.2	Клеточные линии нейробластомы	82

3.1.1.3 Клеточные линии астроцитомы.....	86
3.1.2 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели аденокарциномы молочной железы	90
3.1.3 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели опухолей толстой кишки	94
3.1.4 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели карциномы легкого	98
3.1.5 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели протоковой аденокарциномы поджелудочной железы.....	101
3.2 Исследование онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на клеточные линии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы	109
3.2.1 Исследование онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на модели MIAPaCa-2.....	109
3.2.2 Оценка чувствительности клеточной линии Pan02 к штамму 17D вируса желтой лихорадки.....	111
3.3 Исследование онколитических эффектов штамма 17D вируса желтой лихорадки на сингенной модели протоковой аденокарциномы поджелудочной железы Pan02	118
3.3.1 Оценка онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на протоковую аденокарциному поджелудочной железы Pan02 при однократном внутриопухолевом введении вируса	118
3.3.2 Оценка онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на протоковую аденокарциному поджелудочной железы Pan02 при условии предварительной иммунизации мышей	122
3.3.3 Оценка онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на протоковую аденокарциному поджелудочной железы Pan02 при условии многократного введения вируса.....	126

3.3.4 Анализ количества нейтрализующих антител к вирусу желтой лихорадки и показателей крови мышей	133
3.4 Оценка действия комбинированной терапии вируса везикулярного стоматита с протопорфирином IX на глиобластому человека	137
3.4.1 Оценка цитотоксического действия протопорфирина IX на клеточные линии глиобластомы человека.....	138
3.4.2 Получение комплекса протопорфирина IX с вирусом везикулярного стоматита и оценка его онколитического действия	139
3.4.3 Оценка действия комбинированной терапии вируса везикулярного стоматита с протопорфирином IX на клеточные линии глиобластомы человека.....	144
3.4.4 Оценка действия комбинированной терапии вируса везикулярного стоматита с протопорфирином IX на 3D-сфероидах глиобластомы человека.....	148
Заключение	155
Выводы	157
Практические рекомендации	159
Перспективы дальнейшей разработки темы	160
Список сокращений и условных обозначений.....	161
Список литературы	164
Приложение А	190

Введение

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 [1; 2]. Одним из факторов неблагоприятного прогноза для пациентов с PDAC и глиобластомой является их высокая иммуносупрессия. Преодолеть эту проблему могут помочь онколитические вирусы (ОВ), способные модулировать микроокружение опухоли, переводя ее из иммунологически «холодного» в иммунологически «горячее» состояние. Такой эффект происходит благодаря способности ОВ инфицировать опухолевые клетки, блокировать синтез клеточного белка и запускать каскад реакций, которые завершаются высвобождением цитокинов и молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (damage-associated molecular patterns (DAMP)) [3]. Кроме того, ОВ вызывают гибель опухолевых клеток путем прямого лизиса, в результате которого, помимо высвобождения вирусного потомства, в микроопухолевое окружение попадают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns (PAMP)), DAMP, дебрис опухолевых клеток и опухоль-ассоциированные антигены, что способствует антигенной презентации и инфильтрации опухоли иммунными клетками [3]. Все эти процессы в конечном итоге способствуют созданию устойчивого противоопухолевого иммунного ответа. На сегодняшний день для лечения глиобластомы существует зарегистрированный в Японии препарат Teserpaturev на основе вируса простого герпеса первого типа (ВПГ-1) - G47 Δ , который показал свою эффективность и безопасность в клинических испытаниях второй фазы [4]. G47 Δ был создан путем внесения делеции α 47 в вирус G207, который является его предшественником и имеет делецию обеих копий гена γ 34.5, а также вставку гена LacZ в ген ICP6, что приводит к инактивации гена ICP6 [5]. Помимо этого, на данный момент различные варианты аденовирусов, реовируса, полиовируса,

вируса везикулярного стоматита (ВВС) и других вирусов находятся на стадии доклинических и клинических испытаний для лечения как глиобластомы, так и PDAC. Проведённые исследования показывают, что онколитическая виротерапия, как правило, хорошо переносится, действительно модулирует микроокружение опухоли и способствует существенному повышению длительной выживаемости пациентов [6; 7]. Еще одним кандидатом в ОВ являются флавивirusы, которые представляются весьма перспективными из-за их высокой иммуногенности, удобного для модификации генома, безопасности некоторых вакцинных штаммов (например, штамма 17D вируса желтой лихорадки (ВЖЛ)) и способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, что критически важно при лечении глиобластомы, однако их противоопухолевые свойства мало изучены. Помимо поиска непосредственных кандидатов в ОВ, еще одной важной фундаментальной задачей является изучение механизмов вирусного онколиза, и в этом контексте также можно использовать представителей флавивirusов (ВЖЛ, вирус клещевого энцефалита (ВКЭ)). Благодаря изучению их цитопатического действия (ЦПД) на клетки 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 онколитической виротерапии с традиционными (резекция опухоли, химиотерапия, лучевая терапия) и новыми методами лечения (адоптивная клеточная терапия, ингибиторы иммунных контрольных точек и др.) значительно усиливает противоопухолевые эффекты по сравнению с монотерапией одним из методов [8; 9]. Перспективным подходом является сочетание фотодинамической терапии (ФДТ) и онколитической виротерапии. В этом случае активные формы кислорода (АФК), генерируемые фотосенсибилизатором (ФС), облегчают проникновение ОВ вглубь опухолевой массы, как за счет повреждения самой опухолевой ткани, так и за счет разрушения её сосудистой сети [10]. Исследования

также показывают, что сочетание ФДТ и виротерапии способствует иммуногенной гибели клеток, что имеет решающее значение для активации противоопухолевого иммунного ответа [11]. 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 C1300, аденокарцинома молочной железы EO 771, саркомы MCI, Ридуэя, T241 и 180 [12; 13]. 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 [14]. Было установлено, что предварительная иммунизация мышей штаммом 17D ВЖЛ приводит к увеличению медианы выживаемости животных [14]. Также исследовали рекомбинантный штамм 17D ВЖЛ с инсерцией гена цитотоксического эпитопа Т-лимфоцитов, полученного из куриного овальбумина (ovalbumin, (OVA)). Данный штамм вызывал регресс метастазов меланомы мышей B16-OVA в легких, и при последующем введении клеток B16-OVA мышам формирование опухоли не происходило [15]. 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 опухолевой ткани и ее инфильтрации нейтрофилами, что способствовало подавлению роста первичной и метастатической нейробластомы NXS2 [16]. В других исследованиях на клеточных линиях PDAC (PsPC-1 и BXPC-3) было показано, что комбинированная терапия реовирусом с ФДТ значительно усиливает цитотоксическое действие на опухолевые клетки в сравнении с монотерапией

одним из методов [17]. Действие вируса болезни Ньюкасла совместно с ФС способствует апоптозу клеток рака молочной железы 4T1к, ингибирует их пролиферацию, что сопровождается повышением экспрессии IL-6, STAT3, NF-κB, TNF-α и инфильтрацией ксенотрансплантатов CD8⁺ Т-лимфоцитами [18]. Помимо исследований, где применялось последовательное добавление ФС и ОВ, существуют работы по созданию рекомбинантных штаммов, кодирующих ФС. Так, рекомбинантный вариант ВПГ-1 - G47Δ-KR показал усиление противоопухолевого действия на животных моделях глиобластомы U-87 и менингомы IOMM-Lee. Кроме того, наблюдали иммуногенную гибель клеток и усиление противоопухолевого иммунитета [19]. Полученные результаты свидетельствуют о значительном потенциале комбинированного 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. В качестве исключения следует отметить клеточные культуры человеческих опухолей толстой кишки НСТ-116 и SW620, карциномы легкого A549 и нейробластому SH-SY5Y, однако и в данном случае полной клеточной гибели в результате действия ВКЭ достигнуто не было. Впервые продемонстрировано, что ВЖЛ проявлял онколитическую активность на широкий спектр человеческих опухолевых клеток, включая клеточные культуры опухолей толстой кишки (НСТ-116 и SW620), молочной железы (MCF7, MDA-MB-231), аденокарциному легкого (A549), PDAC (MIAPaCa-2, PANC-1), нейробластому (Kelly, SH-SY5Y) и астроцитому (полученную из послеоперационного материала). Следует отметить, что клеточные линии глиобластомы человека (T98G, LN-229, GL6) 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 (MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-2). В эксперименте на мышинной клеточной линии аденокарциномы поджелудочной железы Pan02 показано, что ВЖЛ способен к проникновению с последующей репродукцией в исследуемой культуре, а также к ингибированию ее роста без видимого лизиса.

На сингенной модели Pan02 впервые показано, что ВЖЛ (штамм 17D) обладает противоопухолевой активностью *in vivo*, где виротерапия иммунизированных мышей приводила к значительному увеличению медианы выживаемости. 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, содержащий фотосенсибилизатор на поверхности ВВС, который продемонстрировал слабую онколитическую активность из-за ингибирующего действия ФС на вирусную репродукцию. Исходя из этого, был разработан протокол, предполагающий не одновременное, а 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 на широком спектре опухолевых клеточных линий позволил выявить отсутствие или

ограниченную онколитическую активность при активной репродукции вируса в большинстве исследуемых клеточных культур. В результате полученных данных и учитывая патогенность данного штамма, его нецелесообразно рассматривать в качестве онколитического агента. Однако при сравнительном анализе генетического профиля различных штаммов ВКЭ и их цитопатогенного действия можно выявить ключевые механизмы онколитической активности флавивирусов, а изучение характерного профиля мутаций опухолевых культур и их чувствительности к ВКЭ может также прояснить некоторые закономерности онколитического действия флавивирусов.

В результате изучения онколитического действия 17D ВЖЛ на клеточных линиях PDAC были выявлены разные эффекты на культурах: лизис, ингибирование роста или репродукция вируса без видимого ЦПД. Было выявлено, что чувствительность клеточной культуры зачастую коррелирует с ее интерфероновым статусом, что позволяет лучше понять онколитический механизм действия ВЖЛ на опухолевые клеточные линии и создает основу для прогнозирования эффективности терапии в зависимости от интерферонового статуса опухоли.

Продemonстрированный противоопухолевый потенциал штамма 17D ВЖЛ на сингенной модели Pan02 позволяет отметить его как перспективный ОВ. При этом, гипотеза об ингибировании роста опухоли иммуноопосредованным образом имеет особое значение, ведь в таком случае ВЖЛ способен модулировать микроопухолевое окружение и активировать противоопухолевый иммунитет.

Изученная синергия ВВС и ФДТ позволяет сделать вывод о перспективности данного подхода для терапии глиобластомы. Также, несмотря на неэффективность полученного комплекса ВВС-протопорфирин IX показано, что вирус способен сохранять свою инфекционность после взаимодействия с малыми молекулами. Благодаря этому возможно 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, клинко-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:

1. Конференция молодых ученых и специалистов Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), (Москва, 2022, 2023, 2024, 2025).
2. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2023, 2026).
3. Международная конференция, посвященная 300-летию РАН ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Москва, 2023).
4. XI Всероссийская молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, 2025).
5. 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.

Глава 1. Обзор литературы

Арбовирусы - это обширная экологическая группа вирусов, которые циркулируют в природе между позвоночными хозяевами и кровососущими членистоногими переносчиками. Эти вирусы являются причиной многих заболеваний из-за своей способности распространяться в различных средах и разнообразия переносчиков. Подавляющее большинство арбовирусов относится к РНК-содержащим вирусам, и исключение составляет лишь вирус африканской чумы свиней, являющийся ДНК-вирусом. Представители арбовирусов принадлежат к одному из восьми семейств: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Nairoviridae*, *Phenuiviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* и *Orthomyxoviridae* [20].

В последние годы арбовирусы привлекают внимание не только как возбудители инфекционных заболеваний, но и как перспективные ОБ, среди которых представители семейств *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae* и *Orthomyxoviridae*. В рамках семейства *Togaviridae* вирусы рода *Alphavirus* являются перспективными противоопухолевыми агентами. Вирус Синдбис, вирус леса Семлики, альфавирус М1, вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей и векторные конструкции на их основе продемонстрировали свою противоопухолевую эффективность *in vitro* и *in vivo* [21]. Среди арбовирусов семейства *Orthomyxoviridae* следует отметить вирус рода *Orbivirus* - вирус синего языка, который показал цитопатическое действие на большом спектре опухолевых клеточных линий [22]. Помимо этого, в экспериментах *in vivo* внутриопухолевые инъекции вируса приводили к уменьшению объема подкожных почечно-клеточных новообразований [23]. Также научный интерес вызывают представители семейств *Flaviviridae* и *Rhabdoviridae* - они будут рассмотрены подробнее в рамках данного обзора.

1.1 Характеристика семейства *Flaviviridae*

1.1.1 Описание и жизненный цикл

Род *Orthoflavivirus* относится к семейству *Flaviviridae* и включает более 70 арбовирусов. Некоторые представители рода *Orthoflavivirus* (далее по тексту флавивирусы) являются высокопатогенными для человека и вызывают такие заболевания как жёлтая лихорадка, лихорадка денге, лихорадка Западного Нила, лихорадка Зика, японский энцефалит, клещевой энцефалит и др. [24]. Патогенность многих флавивирусов связана с их способностью к репродукции в клетках нервной ткани.

Вирионы состоят из нуклеокапсида икосаэдрической формы, сформированного субъединицами капсидного белка С, окруженного липидным бислоем, полученным из мембран хозяина. В суперкапсид встроен гликозилированный белок Е и мембранный белок М [25]. Гликопротеин Е связывается с рецепторами на поверхности клетки-мишени (гликозаминогликаны (ГАГ), фосфатидилсерин, высокоаффинный рецептор ламинина и др.) [26], после чего вирус проникает в клетку рецептор-опосредованным эндоцитозом. Далее происходит раздевание нуклеокапсида и высвобождение вирусной РНК в цитоплазму через пору в эндосоме, которую создает вирусный Е-белок (Рисунок 1А). Геном флавивирусов представлен одноцепочечной молекулой РНК положительной полярности, длиной около 11 тысяч нуклеотидов, кэпированной на 5'-конце и содержащей структуру «стебель-петля» на 3'-конце (Рисунок 1Б), необходимых для стабилизации генома, инициации трансляции и репликации РНК. Также на обоих концах РНК присутствуют нетранслируемые области, содержащие вторичные структуры, которые являются *cis*-регуляторными элементами в процессах трансляции, репликации и упаковки генома. После попадания вирусной РНК в цитоплазму клетки начинается трансляция полипротеина, который затем котрансляционно и посттрансляционно расщепляется вирусной (NS3) и клеточными протеазами до трех структурных (С, рrМ и Е) и семи неструктурных (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) белков [27]. Белки NS2a, NS4a и NS4b

принимают участие в формировании репликативного комплекса. Предполагается, что белок NS1 стабилизирует репликативный комплекс на мембране, удерживая вместе белки NS4a и NS4b, и создавая каркас для репликации [27]. Белок NS3 вовлечен в процессинг вирусного полипротеина. Белок NS5 обеспечивает репликацию геномной РНК и состоит из двух доменов - домена вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и метилтрансферазного домена, вовлеченного в модификацию вирусных кэп-структур. Репликация начинается с синтеза отрицательной цепи РНК, которая в дальнейшем используется как матрица для синтеза геномной РНК [24]. Сборка вирионов происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), где вирусные белки и геномная РНК объединяются с образованием незрелых вирусных частиц. В процессе отпочковывания из ЭПР незрелая вирусная частица получает липидную оболочку и при переходе из ЭПР через сеть транс-Гольджи на клеточную поверхность незрелые вирионы подвергаются протеаза- и рН-зависимому созреванию. Во время созревания Е белок претерпевает значительную реорганизацию, в то время как белок ргМ превращается в М белок, тем самым приводя к созреванию вирионов, которые выходят из клетки в процессе экзоцитоза (Рисунок 1).

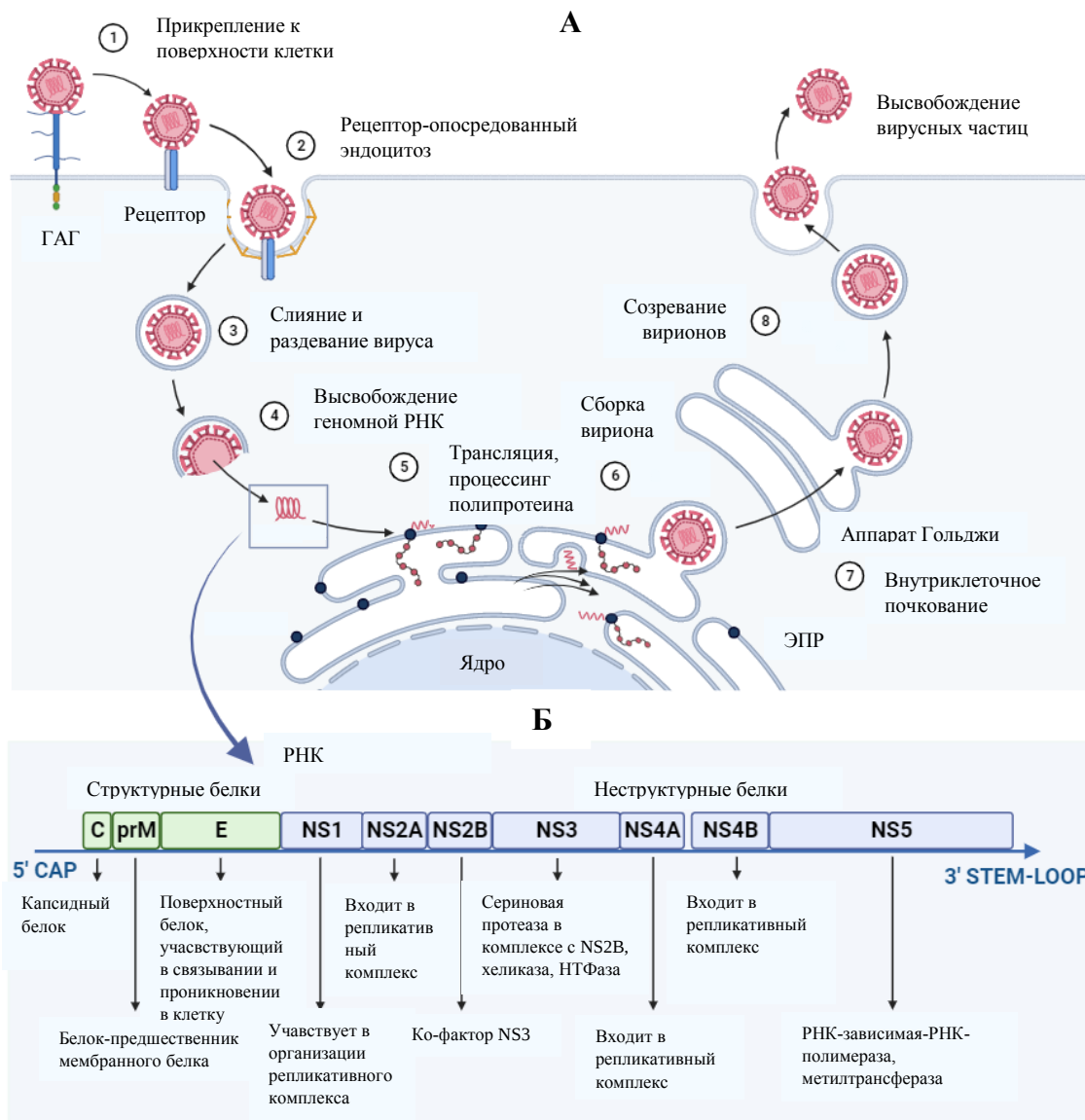


Рисунок 1 - Жизненный цикл флавивирусов. (А) - Репликативный цикл. (Б) – Схема организации генома. Представлен кэпированной одноцепочечной РНК положительной полярности длиной ~11 кб с одной открытой рамкой считывания. Геномная РНК транслируется как один полипротеин, который впоследствии расщепляется на три структурных белка (С, prM/M и E) и семь неструктурных (NS) белков [28]

1.1.2 Онколитические свойства флавивирусов

Первые работы по изучению возможности использования флавивирусов в виротерапии опухолей различного происхождения появились в начале 50-х годов XX века. Было показано, что ВКЭ ингибирует рост различных видов опухолей у мышей, таких как фибросаркома MCI, нейробластома C1300, аденокарцинома молочной железы EO 771, остеогенная саркома Ридуэя, саркома T241 и 180 [12; 13].

В дальнейшем было продемонстрировано, что флавивирuses, включая ВКЭ, вирус Шотландского энцефаломиелита овец, вирус Лангат, вирус Кисанурской лесной болезни и вирус Омской геморрагической лихорадки оказывают цитопатогенное действие на карциному шейки матки (опухолевая клеточная линия HeLa) [8] и ингибируют рост опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [30–32]. Вирус энцефалита Сент-Луис при внутрибрюшинном введении инфицировал клетки мышинной саркомы 180 и увеличивал среднее время выживаемости инфицированных мышей, а также вызывал регресс асцитной карциномы Эрлиха у мышей в 20% случаев [33; 34]. Также, в 1960-х годах были проведены исследования вируса Лангат на предмет его онколитического потенциала. Полного излечения пациентов при однократном введении вируса не наступало, однако в двух из 10 случаев наблюдалось улучшение общего состояния у пациентов с лейкемией и в четырех из 18 случаев отмечались улучшения у пациентов с плоскоклеточной карциномой печени и карциномой легких. Из нежелательных эффектов в большинстве случаев наблюдалась лихорадка, помимо этого у пациента с раком бронхов наблюдались симптомы энцефалита в ответ на виротерапию [35]. Высокая патогенность флавивирuses для животных и человека, неудовлетворительные результаты их онколитической активности в качестве монотерапии, а также появление других более удобных и безопасных вирусных агентов долгое время ограничивали исследования флавивирuses в качестве онкотерапевтических агентов. Вновь возникший интерес к использованию флавивирuses в онковиротерапии связан с исследованиями, посвященными применению аттенуированных флавивирuses, и с возможностью получения генно-модифицированных вирусных агентов, в том числе и флавивирuses с инсерциями терапевтических трансгенов. Так, аттенуированные вирусы Зика, желтой лихорадки, Западного Нила и японского энцефалита оказались эффективны как в случае прямого онколитического действия на ряд опухолей животных и человека, так и для иммунотерапии опухолей при условии предварительной иммунизации пациентов соответствующими вакцинами [14; 36–38].

1.1.2.1 Вирус Зика

Самым изученным из флавивирусов с онколитическим потенциалом является вирус Зика. Вирус Зика способен преодолевать плацентарный барьер, инфицировать плод и вызывать нарушения развития нервной системы, включая микроцефалию у новорожденных. Однако у взрослых пациентов инфекция, вызванная вирусом Зика, обычно протекает бессимптомно, и лишь небольшой процент пациентов (<20%) сообщают о легкой лихорадке, сыпи и боли в суставах в течение примерно 7 дней [39]. Ряд исследований подтвердил, что вирус Зика избирательно инфицирует нервные стволовые клетки плода [40], что побудило ученых исследовать вирус Зика в качестве ОВ в отношении опухолей головного мозга. Было высказано предположение, что рецептором для проникновения вируса Зика в клетки является белок AXL, так как его блокировка снижала инфицирование клеток вирусом и, как следствие, их гибель. Белок AXL представляет собой тирозинкиназу, входящую в семейство TAM киназ, экспрессия которых значительно усиливается при различных типах злокачественных новообразований на поверхности клеток [41]. Это предположение объясняло специфичность действия вируса Зика на нейроны, однако, другие исследования показали, что наличие AXL не является обязательным для проникновения вируса Зика в клетку [42], и, таким образом, на данный момент роль белка AXL в жизненном цикле вируса Зика остается спорной. В других исследованиях было показано, что для онколитического действия вируса Зика необходима экспрессия клеточного поверхностного рецептора CD24 [43; 44]. Восстановление экспрессии CD24 в слабовосприимчивой к вирусу Зика клеточной линии нейробластомы SK-N-AS усиливало онколитический потенциал вируса Зика в сравнении с его воздействием на CD24-дефектную клеточную линию. Также было отмечено, что белок NS5 вируса Зика, в отличие от других неструктурных белков, снижает пролиферацию клеток глиомы, миграцию и инвазию *in vitro* и способствует выживанию мышей C57/BL6 с глиомой [45]. Ряд факторов делает вирус Зика привлекательным для применения в онковиротерапии. Во-первых, его тропность к опухолевым тканям, которая может быть связана с чувствительностью вируса к

интерферону 1 типа [46], сигнальные пути которого часто нарушены при развитии опухоли. Во-вторых, способность вируса Зика подавлять апоптоз, что увеличивает вероятность длительной персистенции вируса в организме после первичного инфицирования [47–49]. В-третьих, возможность отсроченного цитолитического действия вируса Зика на опухолевые клетки может иметь существенное значение в преодолении иммуносупрессии, индуцированной опухолевым микроокружением [3; 50; 51].

На данный момент есть несколько работ, посвященных изучению онколитической активности вируса Зика *in vivo*. В одном исследовании авторы показали, что вирус Зика избирательно заражал клетки глиобластомы, полученные после резекции от пациентов, в сравнении с нейронами и глиальными клетками. Далее авторы получили адаптированный для мышей штамм ZIKV-Dakar и использовали его для лечения мышинной глиобластомы GL-261 и CT-2A. В результате наблюдалось увеличение времени жизни мышей C57BL/6 в сравнении с контрольной группой и уменьшение объема опухоли без проявления неврологических симптомов [46]. При исследовании бразильского штамма вируса Зика - ZIKV^{BR} для терапии медуллобластомы и рабдоидной опухоли наблюдался регресс опухолей и увеличение выживаемости, а у 7 из 29 мышей был отмечен полный регресс опухолей [52]. Также было проведено исследование на иммунокомпетентных собаках с опухолями головного мозга, где при терапии вирусом Зика наблюдалось снижение выраженности неврологических симптомов и уменьшение объема опухоли. Помимо этого, у двух собак было выявлено увеличение количества иммунных клеток в микроокружении опухоли [53]. При использовании вакцинного штамма вируса Зика-ZIKV-LAV для терапии глиобластомы у иммунодефицитных мышей наблюдалось увеличение выживаемости мышей и задержка роста опухоли, также данный штамм показал хороший профиль безопасности: даже при внутримозговом введении вируса мышам неврологических симптомов не наблюдалось. Было установлено, что инфицирование вирусом Зика активирует сигнальный путь TNF- α , исходя из чего можно сделать вывод, что лечение ZIKV-LAV может приводить не только к прямой

гибели клеток, но и к активации противоопухолевого иммунитета. Также было отмечено, что онколитическая активность вируса Зика в отношении глиобластомы связана с экспрессией SOX2 в данных опухолях [54], что приводит к подавлению интерферонового сигнального пути, и тем самым обеспечивает репродукцию вируса Зика [55]. SOX2 является основным регулятором противовирусного ответа и апоптоза и имеет высокий уровень экспрессии в клетках глиобластомы, что объясняет преимущественное литическое действие вируса Зика. Кроме того, SOX2 связан с регуляцией экспрессии интегрин αV . Интегрин αV образует гетеродимеры, в основном с интегрином $\beta 5$, блокада которого специфическими антителами приводит к уменьшению индуцированного вирусом Зика онколитического действия на глиобластомах. Таким образом, SOX2-интегрин $\alpha V\beta 5$, по-видимому, имеет решающее значение для онколитической активности вируса Зика в отношении глиобластомы. На мышинных моделях C57BL/6/J с глиобластомой было показано, что вирус Зика способствует внутриопухолевой инфильтрации CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитами, изменяя тем самым микроокружение опухоли и способствуя противоопухолевому действию [50]. Инфекция, вызываемая вирусом Зика усиливает инфильтрацию опухоли лимфоцитами, причём индукция пролиферации CD8⁺ лимфоцитов в результате лизиса инфицированных опухолевых клеток происходит в течение достаточно длительного времени, и эти лимфоциты защищают мышей от формирования сингенной опухоли при повторном введении опухолевых клеток. Кроме того, терапия вирусом Зика способствует активации сигнального пути интерферона I типа в клетках глиобластомы, усиливает чувствительность глиобластомы к блокаде иммунной контрольной точки PD-L1, а также увеличивает продолжительность жизни мышей и подавляет рост опухоли [50; 56].

1.1.2.2 Вирус желтой лихорадки

Ослабленный (аттенуированный) штамм 17D ВЖЛ также является перспективным кандидатом для онковиротерапии. Для данного штамма определена полная нуклеотидная последовательность генома, он имеет хороший

профиль безопасности в виде вакцинного препарата у иммунокомпетентных детей и взрослых, и используется в профилактических целях для предотвращения заболевания желтой лихорадкой в эндемичных регионах [57]. Поскольку штамм 17D ВЖЛ активно используется в вакцинопрофилактике, следует предположить, что при его внутриопухолевом введении будут проявляться иммуноопосредованные противоопухолевые эффекты. Так, было показано, что ВЖЛ (штамм 17D) проявляет онколитические свойства на моделях меланомы B16-OVA и карциномы толстой кишки MC38 и, хотя введение вируса ни в одном из случаев не приводило к полному излечению, наблюдалась явная задержка роста опухолей. В противоопухолевом действии вируса, помимо литической активности ВЖЛ, играют роль специфические CD8⁺ лимфоциты и индукция синтеза IFN α/β , в то время как натуральные киллеры (natural killer cells, NK-клетки) в этом процессе не участвуют. Иммунизация мышей штаммом 17D ВЖЛ с последующим внутриопухолевым введением вируса приводила к повышению противоопухолевой активности и увеличению выживаемости животных, так же как и комбинированная терапия совместно с блокаторами иммунных контрольных точек anti-PD-1 и anti-CD137 [14]. В других исследованиях рекомбинантный вариант штамма 17D ВЖЛ, несущий ген OVA, работал как эффективная терапевтическая вакцина для лечения солидных опухолей мышей и метастазов легких меланомы мышей B16-OVA [15].

1.1.2.3 Вирус Западного Нила

Вирус Западного Нила (ВЗН) в качестве ОВ впервые был применен в 1950-х годах у пациентов с неоперабельными опухолями поздних стадий различной этиологии. Предварительно пассированный на мышах ВЗН не вызывал клинических симптомов у пациентов, но и противоопухолевого терапевтического эффекта не наблюдалось [58]. Полученный изолят ВЗН - Egypt 101 вызывал заметный регресс опухолей у четырех из 34 протестированных пациентов и менее выраженный регресс у пяти пациентов. Также у большинства пациентов наблюдалась репликация вируса в опухолевых тканях, однако при этом у

нескольких испытуемых был диагностирован энцефалит [59]. В дальнейшем, вероятно, из-за отсутствия выраженного противоопухолевого эффекта и высокой патогенности, ВЗН достаточно долго не привлекал внимания исследователей, но с появлением аттенуированных штаммов интерес к вирусу проявился вновь. Так, живая аттенуированная вакцина WNV-poly(A) была протестирована на модели мышинной меланомы B16F1 [60]. Терапия WNV-poly(A) приводила к ингибированию роста и уменьшению объема опухоли без патологических изменений в здоровых тканях, также наблюдалась активация CD8⁺ лимфоцитов и участие этих клеток в общем противоопухолевом эффекте. На моделях ксенотрансплантатов меланомы человека A375, карциномы яичника SKOV3 и гепатомы Huh7 у мышей BALB/c-nu/nu было показано, что терапия WNV-poly(A) приводила к ингибированию роста и уменьшению объема опухолей без нежелательных побочных эффектов. Вероятно, селективное действие WNV-poly(A) на опухоль обусловлено его чувствительностью к интерферону 1 типа [38]. На основе вируса Кунджин, который является подтипом ВЗН, были разработаны векторные системы экспрессии для доставки РНК, рекомбинантных частиц и плазмидной ДНК [61]. Целевой ген встраивали в рамку считывания вирусного полипротеина-предшественника между белком С (AK20) и оболочечным белком Е (AK22). Недостатком такой системы был низкий выход инфекционных частиц, поэтому в последующем была разработана клеточная линия для облегчения продукции модифицированного вируса Кунджин [62; 63]. Разработанные векторные системы были применены для онковиротерапии на мышинных моделях. Нецитопатогенные вирусоподобные частицы вируса Кунджин, кодирующие гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), локально вводили в опухоли мышам с имплантированной подкожной карциномой толстой кишки СТ26 и с меланомой B16-OVA [64]. Было продемонстрировано излечение более чем 50% животных. Регрессия опухолей СТ26 коррелировала с индукцией противоопухолевых CD8⁺ лимфоцитов, при этом наблюдалась регрессия метастазов карциномы СТ26 в легких, а повторное введение клеток СТ26 мышам не приводило к появлению новообразований. При терапии вирусом меланомы B16-

OVA четыре из шести мышей были вылечены полностью и защищены от повторного заражения опухолью B16-OVA. Введение репликона на основе вируса Кунджин, несущего цитотоксический эпитоп белка E7 вируса папилломы человека 16 типа, защищало от заражения 80% мышей при введении опухолевых клеток, экспрессирующих белок E7, при этом у неинфицированных животных наблюдали активный рост опухоли [65]. В этих экспериментах у иммунизированных вирусоподобными частицами Кунджин мышей не наблюдали рост опухоли в течение 70 дней после первичного и повторного введения опухолевых клеток. Помимо этого, методом стимуляции спленоцитов было показано, что долговременная иммунологическая память у мышей, однократно иммунизированных репликонами Кунджин, может приводить к индукции иммунного ответа в течение как минимум шести месяцев [66]. Полученные данные указывают на эффективность противоопухолевой защиты, индуцируемой несущими опухолевые антигены репликонами на основе вируса Кунджин, свидетельствуют о формировании долговременной иммунологической памяти на опухолевые антигены и, в частности, указывают на возможность применения модифицированных флавивирусных векторов для иммунотерапии.

1.1.2.4 Вирус японского энцефалита

Аттенуированный штамм вируса японского энцефалита JEV-LAV применяется в Китае и других странах с 1989 года для вакцинопрофилактики японского энцефалита, и на данный момент о случаях вакциноассоциированного энцефалита не сообщалось [67]. Данный штамм был протестирован в качестве противоопухолевого агента. Так, при внутриопухолевом введении JEV-LAV мышам с ортотопической глиобластомой GL-261-luc наблюдались ингибирование роста опухоли и уменьшение ее объема, что в конечном итоге приводило к увеличению продолжительности жизни мышей [36]. Помимо этого, было обнаружено, что терапия этим вирусом приводит к инфильтрации опухоли CD8+ лимфоцитами, а также повышению экспрессии PDL-1. Эти данные побудили исследователей применить комбинированную терапию с блокатором иммунных

контрольных точек anti-PD-L1, что улучшало результаты монотерапии. Следует отметить, что у мышей после внутримозговой инъекции JEV-LAV не наблюдалось каких-либо побочных эффектов.

1.1.2.5 Вирус денге

Первые упоминания о возможности применения вируса денге в качестве онколитического агента относятся к началу 1980-х годов. При лечении вирусом мышей *Albinomice* с асцитной карциномой Эрлиха в 20% случаев наблюдался регресс опухолей [34]. Данные результаты казались недостаточными с учетом высокой патогенности вируса денге и наличия низкопатогенных и при этом более литически активных вирусов, таких как ВВС или вирус болезни Ньюкасла. Однако с развитием генно-инженерных методов и появлением новых аттенуированных штаммов вирус денге вновь привлек внимание исследователей. Так, аттенуированный штамм вируса денге - PV001-DV исследовали в качестве онколитического агента *in vitro* и *ex vivo*. PV001-DV вызывал апоптоз клеток меланомы человека A2058, SK-MEL-2, SK-MEL-5 и SK-MEL-28, а также в результате действия вируса повышалась экспрессия PD-L1, что позволяет рассматривать комбинированную терапию с anti-PD-L1 как перспективную стратегию терапии. Также онколитический эффект штамма PV001-DV был продемонстрирован на модели меланомы пациента *ex vivo* [68]. В последующем авторы планируют оценить противоопухолевые эффекты PV001-DV на животной модели.

Таким образом, флавивирuses представляют собой перспективный класс онколитических агентов, однако для раскрытия их терапевтических возможностей и повышения безопасности применения требуются дополнительные исследования.

1.2 Характеристика семейства *Rhabdoviridae*

1.2.1 Описание и жизненный цикл

Вирусы, которые относятся к семейству *Rhabdoviridae*, заражают широкий спектр млекопитающих, включая человека, передача обычно происходит трансмиссивно (через укусы гнусов, комаров и т.д.). Наиболее опасным из семейства *Rhabdoviridae* является вирус бешенства, который относится к роду *Lyssavirus*. Наиболее изученный представитель семейства *Rhabdoviridae* относится к роду *Vesiculovirus* и является вирусом везикулярного стоматита, вызывающим заболевание у крупного рогатого скота, свиней и лошадей [69].

Пулевидные вирионы рабдовирусов являются оболочечными. В мембрану встроен гликопротеин G, который отвечает за взаимодействие вируса с рецептором клетки-мишени. Под мембраной находится слой, образованный матричным белком М, который придает вириону пулевидный вид (Рисунок 2А). Белок нуклеокапсида N состоит из двух основных и двух дополнительных доменов, простирающихся от N- и C-концов. Геномная линейная РНК отрицательной полярности оборачивается вокруг основной N-концевой части белка, а C-концевой домен белка N покрывает связанную РНК. Также нуклеокапсид связан с ещё двумя вирусными белками: фосфопротеином Р и белком L. Белок Р содержит сайты фосфорилирования и участвует в регуляции транскрипции. Белок L обладает полимеразной активностью, а также, по-видимому, выполняет кэпирование и полиаденилирование вирусных мРНК [70]. Рецептором для связывания G-белка с клеткой-мишенью для ВВС считаются ганглиозиды [71]. Вирус проникает в клетку клатрин-зависимым эндоцитозом с последующим закислением эндосомы и высвобождением нуклеокапсида в цитоплазму. Для транскрипции вирусная полимераза использует механизм «Start-Stop». Транскрипция происходит постепенно: полимераза поочередно синтезирует, кэпирует, полиаденилирует мРНК для каждого белка. Геномная РНК содержит стоп-кодона, где вирусная полимераза завершает синтез мРНК, добавляя к её 3'-концу (поли)А-хвост, а затем сканирует геномную РНК дальше до следующего старт-кодона - процесс

продолжается до тех пор, пока полимераза не синтезирует все вирусные мРНК с геномной РНК (Рисунок 2Б). Механизм транскрипции регулируется взаимодействием цис- регуляторных сигналов (например, ТТР, ТІ) между полимеразой и вирусной(-)РНК. На каждом стоп-кодоне часть вирусных полимераз диссоциирует от (-)РНК, а часть продолжает синтез далее. Из-за этого феномена присутствует градиент концентраций каждой мРНК, который необходим для регулирования количества вирусных белков. Далее следует трансляция отдельных мРНК для каждого белка, и после накопления вирусных белков (преимущественно белка N) вирусная полимераза переключается с транскрипции мРНК на синтез полноразмерных антигеномных (+)РНК, где комплекс белков N/P обеспечивает структурную и шаперонную поддержку для синтеза. Далее по матрице антигеномной (+)РНК происходит синтез геномной (-)РНК, которая в процессе репликации ассоциируется с белком N, формируя нуклеокапсидные комплексы [72]. Синтезированные белки и нуклеокапсид транспортируются к клеточной мембране, белок G по мере перемещения подвергается посттрансляционным модификациям, включая гликозилирование [72]. На клеточной мембране нуклеокапсид собирается в комплекс с белком M и далее происходит почкование вирусных частиц с помощью эндосомального сортировочного комплекса, необходимого для транспорта ESCRT (Рисунок 3).

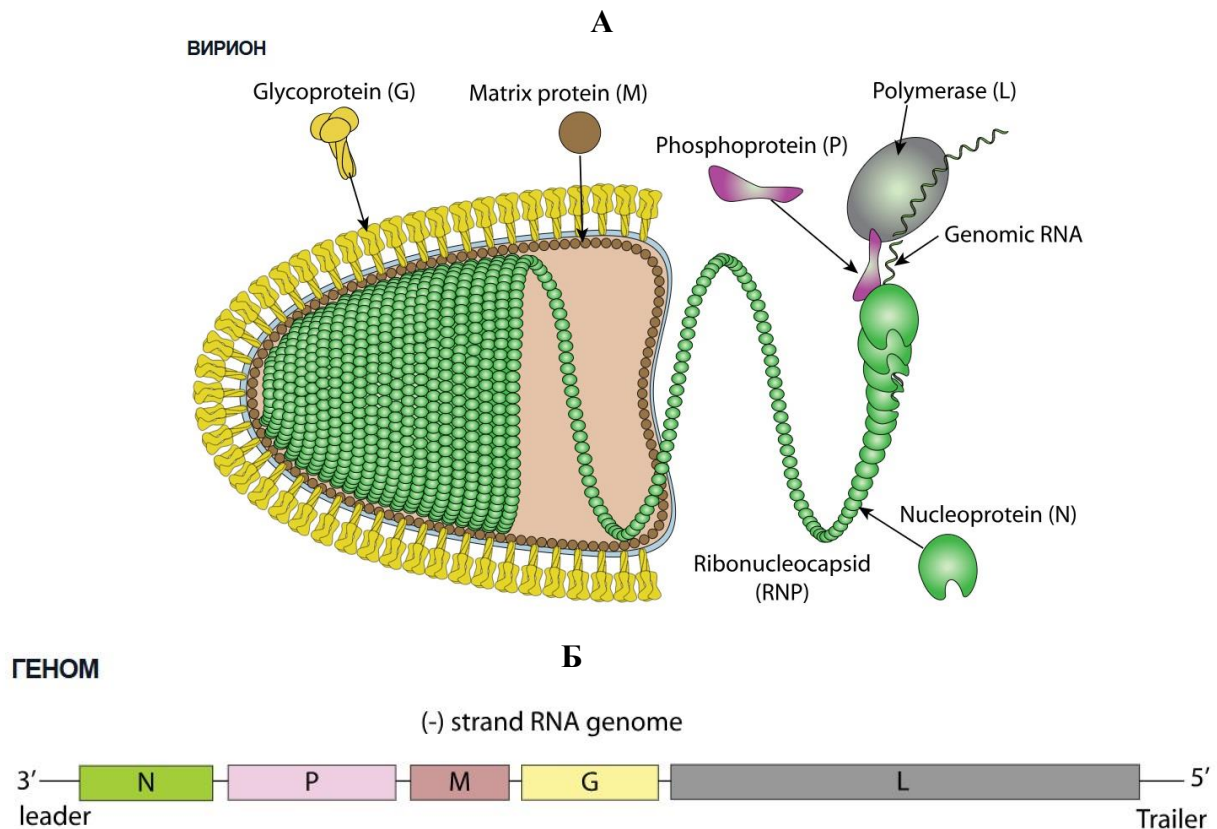


Рисунок 2 – Вирион и геном рабдовирусов. (А) Пулевидный вирион рабдовирусов. (Б) Геном рабдовирусов представлен линейной отрицательной одноцепочечной РНК размером около 11-15 кб. Геном вируса состоит из двух сегментов, кодирующих 5 белков. В ходе трансляции образуется мРНК для каждого белка (адаптировано по: ViralZone [73])

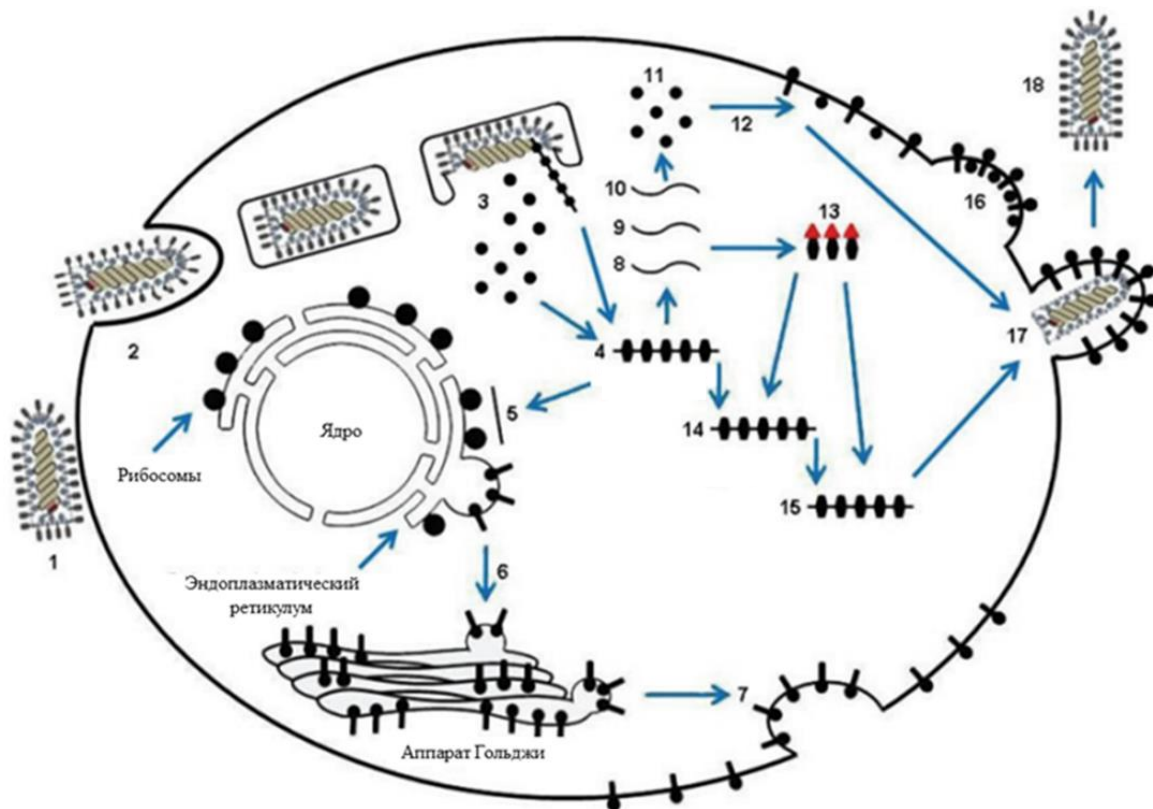


Рисунок 3 - Жизненный цикл рабдовирусов. (1) - прикрепление вируса к поверхности клетки; (2) - проникновение вируса в клетку путем актин-зависимого клатрин-опосредованного

эндоцитоза; (3) - слияние с мембраной эндосомы; (4) - транскрипция (-) РНК; (5, 6) - синтез и гликозилирование G-белка; (7) - доставка G-белка к поверхности цитоплазматической мембраны; (8, 9, 10) - образование мРНК для белков N, P и M; (11) - трансляция мРНК; (12) - миграция M-белка к поверхности плазматической мембраны; (13) - образование N-P комплекса; (14) - синтез полноразмерной (+) РНК; (15) - репликация полногеномной (-) РНК; (16, 17, 18) - почкование с поверхности плазматической мембраны (адаптировано по: Reis. L. R. et al., 2009 [74])

1.2.2 Онколитические свойства вируса везикулярного стоматита

ВВС является одной из основных моделей в вирусологических исследованиях, и его онколитические свойства достаточно хорошо изучены. Несколько характеристик ВВС делают его хорошим кандидатом для онколитической виротерапии [75]:

- низкая патогенность для человека;
- высокая чувствительность к интерферону, что обеспечивает селективность размножения в опухолевых клетках;
- широкий тропизм. Для проникновения в клетку-мишень ВВС использует фосфатидилсерин, который находится на поверхности практически всех типов клеток животных;
- отсутствие нейтрализующих антител, препятствующих репликации вируса, у большинства людей;
- способность ВВС эффективно разрушать сосудистую сеть опухоли [76].

Изначально онколитические свойства ВВС изучали на диком штамме Индиана. Было показано, что ВВС способен эффективно лизировать большой спектр опухолевых клеточных линий *in vitro*, при этом здоровые клетки остаются незатронутыми [77; 78]. Высокая эффективность ВВС подтверждалась и на животных моделях. Например, при внутриопухолевом введении вируса в дозе 10^7 БОЕ/мл мышам Nude с подкожной глиобластомой C6 наблюдалось выраженное подавление роста опухоли у всех животных [79]. Деградация подкожных опухолей была также показана на иммунокомпетентных мышах с меланомой B16 и опухолью молочной железы D1-DMBA3 при внутриопухолевом введении [80], а также при системном введении на модели карциномы толстой кишки CT26 [77]. Однако

исследования показывают нейротоксичность BBC у грызунов при интракраниальном, интраназальном, системном и внутрибрюшинном введении [81], а также у макаков при интраназальном и внутримозговом введении [82]. По этой причине были разработаны штаммы со сниженной нейротоксичностью без потери онколитической активности.

1.2.2.1 Штамм VSV-IFN β

Штамм VSV-IFN β , кодирующий интерферон β (IFN- β), является наиболее широко используемым среди других штаммов BBC. Экспрессируемый интерферон обеспечивает защиту нормальных клеток, тогда как у опухолевых клеток интерфероновые пути часто дисфункциональны. Отсутствие нейротоксичности данного рекомбинанта было показано на грызунах и приматах, более того, включение IFN- β в вирус усилило его онколитические свойства [83]. Так, VSV-IFN β оказывает эффект на немелкоклеточный рак легких. На иммунодефицитных мышах Nude VSV-IFN β ингибировал рост ксенотрансплантантов A549 и H2009, и во втором случае эффект был лучше в сравнении с диким типом BBC. Также на иммунокомпетентных мышах с опухолями LM2 наблюдался полный регресс опухоли у 30% животных. Следует отметить, что неврологических симптомов у животных не наблюдалось [84]. На модели рака простаты при использовании VSV-IFN β было показано ингибирование роста опухоли как на модели человеческих ксенотрансплантантов LNCaP и PC3 у мышей Nude, так и на сингенной модели RM9 на мышах C57BL/6, однако полного регресса опухоли не наблюдалось [85]. Регресс опухоли в доклинических исследованиях был отмечен на моделях меланомы, рака толстой кишки и аденокарциномы эндометрия [86]. Таким образом, VSV-IFN β показывает высокую противоопухолевую активность в отношении опухолей различной этиологии, и несмотря на то, что в некоторых исследованиях на иммунодефицитных мышах все еще сообщается о его нейротоксичности, большинство клинических испытаний проходят именно с этим вариантом BBC. В испытаниях первой фазы штамм VSV-IFN β -NIS на пациентах с рецидивирующими рефрактерными гематологическими злокачественными

новообразованиями было показано, что вирус можно безопасно внутривенно вводить пациентам до уровня дозы $1,7 \times 10^{11}$ TCID₅₀, а также от терапии наблюдался положительный эффект у пациентов с Т-клеточной лимфомой. На данный момент планируются клинические испытания вируса с иммуномодулирующими препаратами [87], помимо этого проходят испытания на моделях нейроэндокринной карциномы [88], колоректального рака, меланомы, рака эндометрия и рака головы и шеи [89].

1.2.2.2 Штаммы rM51R-M и rVSV-ΔM51

Помимо роли в сборке вируса, белок М ВВС ингибирует транскрипцию, ядерно-цитоплазматический транспорт РНК и трансляцию, что подавляет выработку интерферона и противовирусных белков в инфицированных клетках. Поэтому модификации белка М ограничивают способность вируса подавлять врожденный противовирусный ответ. Были разработаны штаммы с мутацией в белке М - rM51R-M и с делецией в белке М - rVSV-ΔM51, в них белок М сохраняет свои функции в сборке вируса, но не способен ингибировать экспрессию генов хозяина [90]. Разработанные штаммы тестировали на предмет онколитической активности. Так, ВВС (штамм rM51R-M) лизировал ксенотрансплантанты опухоли простаты LNCaP не хуже немодифицированного ВВС, при этом у мышей не наблюдалась вирусная инфекция, которая отмечалась при заражении диким типом вируса. В этом исследовании также отмечено, что интактная по интерферону клеточная линия рака простаты PC-3 резистентна к действию вируса [90]. Онколитическая активность вируса отмечена и в отношении колоректальных опухолей. Было показано, что ВВС (штамм rM51R-M) индуцирует апоптоз в клеточной линии колоректального рака SW480 [91], а также эффективно предотвращает перитонеальное распространение колоректальных опухолевых клеток у мышей [92]. Однократное внутрибрюшинное введение rM51R-M в дозе 5×10^6 БОЕ/мл подавляет рост внутрибрюшинных опухолей CT-26 у мышей, увеличивает количество перитонеальных CD4⁺ лимфоцитов, антигенпрезентирующих B1b клетки, однако снижает выработку IL-6. Также после

лечения вирусом не наблюдалось рецидива опухоли вплоть до 60 дней. В другом исследовании BBC (штамм VSV(M51R)-LacZ) показал свою онколитическую эффективность в отношении метастазов опухоли молочной железы в легких. Вирус при системном введении инфицировал множественные очаги опухолей молочной железы при отсутствии токсичности, что приводило к значительному увеличению медианы выживаемости иммунокомпетентных мышей [93]. Также были проведены исследования BBC (штамм rM51R-M) на предмет безопасности, где было показано, что при интернальном введении вирус не проникал в центральную нервную систему (ЦНС) и через 2 дня не обнаруживался на слизистой оболочке носа, в отличие от дикого BBC [94]. Для другого штамма - rVSV-ΔM51 была показана противоопухолевая эффективность на модели PDAC. Вирус ингибировал рост ксенотрансплантатов PANC-1 и MIAPaCa-2 и не оказывал терапевтического эффекта на опухоли SU.86.86 и HPAF-II, у которых, вероятно, интерфероновые пути были интактны [95].

1.2.2.3 Штамм VSV-GP

Поскольку нейротоксичность BBC обеспечивается G-белком, для снижения токсичности был сконструирован штамм VSV-GP с замененным G-белком на ненейротропный гликопротеин вируса лимфоцитарного хориоменингита. Этот вариант BBC продемонстрировал сниженный нейротропизм в мышечных моделях по сравнению с диким типом вируса [96]. Кроме того, внутриопухолевое введение штамма VSV-GP привело к регрессу подкожных ксенотрансплантатов глиобластомы G62, а системное введение - как минимум двукратному увеличению продолжительности жизни мышей с ортотопической глиомой U87 [97]. Полный регресс наблюдали на ксенотрансплантатах рака простаты Du145 после всего лишь двух внутриопухолевых введений вируса, а задержка роста сингенных опухолей TRAMP-C1 - при трехкратном введении вируса [98]. Эффективная репликация и высокая литическая активность штамма VSV-GP была показана на сингенной модели рака легких LLC1, также авторами было отмечено, что хотя и наблюдалась активация иммунных клеток, включая CD8⁺ лимфоциты, основным

терапевтическим механизмом являлся лизис клеток за счет инфекции, вызванной BBC [99]. Клинические испытания данного штамма в настоящее время проводятся на пациентах с PDAC, однако результаты пока не опубликованы [89].

1.2.3 Механизмы резистентности опухолей к вирусу везикулярного стоматита

Несмотря на определенный успех BBC как ОВ проблема противовирусных механизмов, которые сохраняют некоторые опухоли, остается нерешенной. Сохранение сигналов интерферона в опухоли - одно из основных препятствий к успешной виротерапии, опосредованной BBC, что подтверждает множество исследований. Например, клеточная линия аденокарциномы предстательной железы LNCaP с нарушенными интерфероновыми путями эффективно лизируется BBC, в то время как клеточная линия аденокарциномы предстательной железы PC3 с сохраненным интерфероновым статусом остается к нему нечувствительной [90]. Было показано, что в клеточной линии PC3 интерферон активирует экспрессию генов-супрессоров опухоли MAP3K7 и CHD1, подавление которых приводит к успешному онколизу, опосредованному BBC [100]. В других исследованиях также было показано супрессивное влияние генов, стимулируемых интерфероном (interferon-stimulated genes, ISG) на вирусный онколиз. Репликация штамма VSV-ΔM51-GFP практически отсутствует в опухолевых клетках поджелудочной железы, экспрессирующих MxA и OAS1, которые являются одними из основных белков противовирусного ответа, стимулируемых интерфероном [101]. Помимо опухолей поджелудочной железы, отмечена устойчивость к BBC некоторых видов гепатоцеллюлярной карциномы и меланомы из-за высокого уровня экспрессии Mx1 [102], и, в случае меланомы, также высоким уровнем экспрессии APOBEC3 [103]. Кроме того, активация протеинкиназы R также играет одну из ключевых ролей в устойчивости клеток к инфекции, вызываемой BBC: ингибирование синтеза белка фосфолированием eIF2 α препятствует репродукции BBC в клетке-мишени [104].

Еще одной причиной резистентности опухолевых клеток к вирусному онколизу может стать иммуносупрессивное микроокружение опухоли. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, являются одним из факторов устойчивости опухолей яичников и молочной железы к онколитической терапии. Также резистентность опухолей к виротерапии зависит от активности интерферона β , который стимулирует опухолеассоциированные макрофаги [105]. Помимо этого, положительная роль NK-клеток, которые могут способствовать локализации ВВС в солидных опухолях [106], подвергается сомнению. Было показано, что опосредованное NK-клетками уничтожение инфицированных клеток может снизить общую онколитическую активность ВВС [107]. Клетки жировой ткани - адипоциты, присутствующие в микроокружении некоторых видов опухолей, могут способствовать устойчивости опухоли к инфицированию ВВС [108]. Более того, плотный внеклеточный матрикс в опухолях является структурным барьером, препятствующим распространению ВВС [109], а гипоксия повышает устойчивость к виротерапии за счет усиления действия интерферона и активности фактора HIF-1 α (hypoxia-inducible factor (HIF)) [110; 111].

Различные онкогены также могут влиять на эффективность виротерапии. Например, было показано, что мутированный CSDE1 был одной из причин рецидива опухолей у пациентов, которых лечили rVSV-IFN β [112]. Онкоген CSDE1 (также известный как N-RAS) экспрессируется в разных типах опухолей и обуславливает их высокую злокачественность, способствует метастазированию и ингибированию апоптоза [113]. Помимо этого, мутированный CSDE1 ингибирует репликацию ВВС, однако присутствие антигенной презентации CSDE1 усиливает онколитическую терапию. Авторы показали эффективность ВВС (штамм VSV-mIFN β -CSDE1) на моделях меланомы и гепатоцеллюлярной карциномы, который оказывал как прямое лизирующее, так и иммуномодулирующее действие на опухоль [112]. Другой онкоген - SIRT1 ингибирует p53, а, следовательно, и апоптоз в опухолевых клетках. Повышенная экспрессия SIRT1 наблюдается при раке простаты, яичников и колоректальном раке. Также отмечена противовирусная функция SIRT1, и было показано, что снижение экспрессии SIRT1 усиливает

онколитическое действие штамма VSVΔM51 в резистентной клеточной линии PC3 [114].

1.2.4 Стратегии усиления онколитической терапии вируса везикулярного стоматита

Исходя из знаний о механизмах резистентности опухолей к виротерапии, на данный момент разрабатываются различные подходы для усиления вирусного онколиза.

1.2.4.1 Стратегии использования интерферона

При сравнении защитных эффектов IFN- α 2a и IFN- β против инфекции, вызванной BBC, в клетках плоскоклеточного рака головы и шеи HNSCC IFN- β обеспечивал большую защиту от онколиза, чем IFN- α 2a при эквивалентных уровнях биоактивности, тогда как нормальные клетки были одинаково защищены обоими подтипами интерферона [115]. Исходя из вышесказанного можно выдвинуть предположение, что сочетание онколитической виротерапии с IFN- α 2a может повысить селективность BBC в отношении опухолевых клеток [115]. С другой стороны, сочетание BBC с ингибиторами сигналов интерферона, такими как IFNAR или JAK, может смягчить онколитическую резистентность в опухолевых клетках, однако при таком подходе необходимо учесть вопрос защиты от вирусной инфекции нормальных клеток, например, выбором способа введения ингибиторов. В одном из примеров такого подхода был использован ингибитор JAK1 на устойчивой к BBC клеточной линии синовиальной саркомы SW982. Как и ожидалось, ингибитор позволил адаптированному к глиобластоме штамму VSV-grp30 эффективно лизировать опухолевые клетки как *in vitro*, так и *in vivo*, при этом авторы не наблюдали признаков вирусной инфекции в здоровых тканях [116]. Аналогичные результаты были получены на модели рака головы и шеи SCC25 и SCC15. Всего час воздействия ингибиторов JAK1 и руксолитиниба может полностью подавить резистентность опухолевых клеток к инфекции, вызываемой

BBC [117]. Устойчивость к VSV-ΔM51 опухолей поджелудочной железы также преодолевалась воздействием на них ингибиторов JAK1, руксолитиниба или TRCA-1. Ингибитор снижал продукцию противовирусных белков MxA и OAS [101; 118]. Изначально нечувствительный к BBC рак яичников эффективно лизируется *in vitro* и *in vivo* после воздействия на него ингибиторов JAK1 и руксолитиниба без значительной токсичности для иммунодефицитных животных [119]. Помимо этого, были протестированы 33 клеточные линии опухолей яичников, полученных от пациентов, 12 из которых сохраняли функциональные интерфероновые пути. Как и ожидалось, эти 12 клеточных линий были устойчивы к BBC, а ингибитор JAK1 делал их восприимчивыми к инфекции [120].

1.2.4.2 Неклассические рекомбинанты вируса везикулярного стоматита

Модификация BBC для экспрессии иммуномодулирующих белков, таких как GM-CSF, IL-12 или IFN- γ , может усилить локальные иммунные реакции и улучшить вирусный онколиз. Например, внутриопухолевые инъекции рекомбинанта BBC, экспрессирующего IL-12, оказывали лизирующее действие на плоскоклеточные карциномы SCC в сингенной ортотопической модели. При этом в сравнительной характеристике со штаммом rVSV-F, экспрессирующим белок слияния вируса болезни Ньюкасла, rVSV-IL12 показал лучшую противоопухолевую активность [121]. Такая стратегия полезна, с точки зрения защиты от вирусной инфекции здоровых тканей, поскольку IL-12 необходим для восстановления ЦНС мышей после инфекции, вызываемой BBC [122]. Рекомбинант BBC со вставкой трансгена для экспрессии белка Smac/DIABLO также показал высокую противоопухолевую активность на ксенотрансплантатах опухолей молочной железы. Белок Smac/DIABLO противодействует ингибиторам апоптоза, его синергия с BBC значительно уменьшала размер опухоли и увеличивала выживаемость мышей в сравнении с диким типом вируса. Авторы предлагают такую стратегию лечения для опухолей, которые резистентны к более классическим рекомбинантам, таким как VSV-IFN β [123].

1.2.4.3 Противоопухолевые вакцины на основе вируса везикулярного стоматита

Противоопухолевые вакцины представляют собой инновационный метод иммунотерапии. Помимо прямого вирусного онколиза, можно усилить активацию противоопухолевого иммунитета за счет различных антигенов, которые можно внедрить в ВВС. Примером такой работы может стать рекомбинант ВВС с онкогенным белком Е7 вируса папилломы человека 16 типа - VSV1-16Е7. Вектор использовался для вакцинации мышей с сингенными опухолями ТС-1, которые экспрессируют белок Е7 HPV16. В результате наблюдалась выработка специфических для Е7 Т-клеток, которые проявили цитотоксическую активность против опухолевых клеток. Через 14 дней после вакцинации средний объем опухолей был в 10 раз меньше в вакцинированной группе мышей в сравнении с группой, получавшей немодифицированный ВВС, а в некоторых случаях наблюдалась регрессия уже существующих опухолей [124]. Целая библиотека кДНК, синтезированной из мРНК, транскрибируемых в клетках человеческой простаты, была клонирована в ВВС, рекомбинантный вирус был назван VEASEL. Авторы предположили, что широкий спектр опухолеассоциированных антигенов для иммунного отбора может быть обеспечен путем экспрессии генов из библиотеки кДНК нормальной ткани того же гистологического типа. Было обнаружено, что 9 внутривенных введений такого рекомбинанта излечили 80% мышей с опухолями простаты ТС-2, при этом введение классического ВВС не вызвало полной деградации опухоли. Также удивителен тот факт, что внутривенная инъекция VEASEL была более эффективна, чем внутриопухолевая, что указывает на то, что деградация опухоли происходит за счет презентации опухолеассоциированных антигенов, а не только за счет прямого лизирующего действия вируса [125]. В продолжении своей работы авторы клонировали библиотеку кДНК клеток меланомы в ВВС. 9 внутривенных инъекций излечили 60% мышей с подкожной меланомой В16, не оказав при этом эффекта на опухоли ТС-2 [126]. Были идентифицированы ключевые опухолеассоциированные

антигены, участвующие в отторжении опухоли, такие как N-Ras, Cyt-c и TYRP-1. Излеченные животные наблюдались в течение 60 дней, и в обеих работах авторы не обнаружили аутоиммунных реакций. Однако, в то время как терапия BBC с N-Ras, Cyt-c и TYRP-1 оказала эффект на подкожные меланомы, она была совершенно не эффективна в отношении интерцеребральной меланомы B16. Иммунологический скрининг выявил, что для интерцеребральных опухолей эффективна презентация других антигенов: (HIF)-2 α , Sox-10, c-Myc и TYRP-1. Таким образом, иммунологический профиль опухолевых антигенов, экспрессируемых клетками одного и того же гистологического типа, определяется анатомическим расположением опухоли. Поэтому авторы сконструировали BBC, экспрессирующий (HIF)-2 α , Sox-10, c-Myc и показали его эффективность в отношении интрацеребральной меланомы B16 и глиомы GL-261 [127].

1.2.4.4 Терапия с ингибиторами гистондеацетилаз

Для усиления онколитического действия BBC также используют комбинированную терапию с эпигенетическими модуляторами, такими как ингибиторы гистондеацетилаз (Воринонат, MS-275). Воринонат опосредованно стимулирует активность NF- κ B, что приводит к индукции аутофагии, апоптоза и подавлению интерферонового ответа. Его комбинация с BBC снижает резистентность клеточных линий к вирусной инфекции, позволяя вирусу эффективно лизировать опухоль, что было показано на клеточной линии рака предстательной железы PC3 [128]. Следует отметить, что действие вориноната обратимо, и при его отмене клетки снова начинают эффективно бороться с инфекцией, вызванной BBC. В другом исследовании аналогичный эффект отмены резистентности был показан не только на PC-3, но также и на первичных опухолях простаты, толстой кишки и легких [129]. Обработка воринонатом или его аналогом MS-275 первичных опухолей специфически усиливала репликацию и распространение VSV- Δ M51 только в эксплантатах опухоли, но не в нормальных тканевых срезах. Помимо этого, эффективность данной методики была исследована *in vivo* на ксенотрансплантатах рака простаты PC3, толстой кишки

HT29, SW620, молочной железы 4T1, меланомы M14, а также на модели спонтанного двустороннего рака яичников. Изначально мышей с подкожными опухолями PC3, M14 и HT29 лечили внутриопухолевой инъекцией вируса совместно с MS-275. Терапия MS-275 стимулировала репликацию VSV-ΔM51 в каждой опухолевой модели, при этом инфицирования здоровых тканей не наблюдалось. Также авторы наблюдали разрушение сосудистой сети опухоли благодаря инфекции VSV-ΔM51. У мышей с опухолью 4T1, помимо подкожных ксенотрансплантантов, обнаруживались и метастазы. Репликация VSV-ΔM51 в комбинации с MS-275 при внутривенном введении наблюдалась как в основной опухолевой массе, так и в метастазах, при этом монотерапия VSV-ΔM51 была неэффективна. Самое выраженное действие комбинированной терапии (отсутствие роста опухоли) было обнаружено на SW620, а практически отсутствие эффекта - на опухолях яичников [129]. Таким образом, за счет способности ингибиторов гистондеацетилаз угнетать действие интерферона, их комбинированная терапия с BBC может рассматриваться как перспективная противоопухолевая стратегия.

1.2.4.5 Терапия с ингибиторами иммунных контрольных точек

Иммунные контрольные точки (ИКТ), такие как PD-1, PD-L1, CTLA-4 регулируют активность Т-клеток, препятствуя аутоиммунным процессам. Известно, что опухоли используют ИКТ, чтобы уклоняться от действия иммунной системы, поэтому ингибиторы ИКТ являются достаточно эффективной противоопухолевой терапией, но все же недостаточной. Комбинированная терапия ИКТ с ОБ давно исследуется, не исключение и BBC. Например, лечение VSV-IFNβ-NIS в сочетании с антителами анти-PD-L1 показало увеличение выживаемости мышей и усиление противоопухолевой активности в сравнении с монотерапией на модели острого миелоидного лейкоза [130]. Добавление антитела анти-PD1 к VSV-HIF-2α, VSV-Sox-10 и VSV-с-Мус усилило противоопухолевую терапию ортотопических глиом GL-261, в то время как добавление антитела анти-CTLA4 не дало никакого терапевтического эффекта. Тем не менее, тройная терапия VSV-HIF-2α, VSV-Sox-10 и VSV-с-Мус с антителами анти-PD1 и анти-CTLA4 дала

наибольший эффект в сравнении с монотерапией рекомбинантов ВВС или в сочетании с одним ингибитором ИКТ [127]. На сегодняшний день оценены не только эффекты совместного применения ВВС и ИКТ как отдельных компонентов, но также создан вектор, экспрессирующий растворимую форму белка PD-L1 - rM51R-M-PD-L1. Как и ожидалось, вектор продемонстрировал лучшую противоопухолевую активность в сравнении с монотерапией rM51R-M или PD-L1. Наблюдались снижение роста опухоли, инфильтрация CD8⁺/CD4⁺ лимфоцитами, и увеличение продолжительности жизни у пролеченных мышей с карциномой легких hPD-L1 LLC [131]. В совокупности эти исследования демонстрируют терапевтический потенциал комбинирования ВВС с ИКТ для усиления противоопухолевого иммунитета.

1.2.4.6 Совместное применение с химиотерапией или лучевой терапией

Химиотерапия или радиотерапия в синергии с ВВС могут повысить эффективность противоопухолевой терапии. Два штамма — sVSV-F и rVSV-IL12 были протестированы в комбинации с цитотоксическим препаратом цисплатин. Было обнаружено, что такое сочетание повышает эффективность онколитической терапии на клеточных линиях плоскоклеточной карциномы SCC VII, SCC 09 и SCC 38, не оказывая при этом влияния на здоровые кераноциты. На сингенной мышинной модели комбинация цисплатина с rVSV-F снижала опухолевую нагрузку и увеличивала выживаемость, однако сочетание цисплатина с rVSV-IL12 не показало лучший эффект по сравнению с монотерапией rVSV-IL12. Монотерапия rVSV-IL12 в целом показала лучшую выживаемость в сравнении со всеми группами [132]. Вероятно, цисплатин подавляет противоопухолевые эффекты интерлейкина 12, поэтому важно правильно подобрать препарат и штамм для улучшения эффектов онколитической терапии. Помимо цисплатина, исследована другая комбинация - VSV-ΔM51 с гемцитабином. Усиление противоопухолевых эффектов наблюдалось на сингенной модели рака поджелудочной железы KCM, но полного излечения мышей достигнуто не было [133]. Сочетание VSV-ΔM51 с лучевой терапией приводит к подавлению роста ксенотрансплантатов гипофарингеальной опухоли

FaDu. Комбинированная терапия увеличила продолжительность жизни мышей в 2 раза по сравнению с терапией только VSV-ΔM51 [134]. Таким образом, комбинированная терапия со стандартными методами лечения опухолей имеет свои перспективы, но из-за известной токсичности цитостатиков и отсутствия при этом полного регресса опухолей, возможно, комбинация с другими методами лечения имеет больше перспектив.

1.2.4.7 Терапия с другими онколитическими вирусами

Совместное применение онколитических вирусов для усиления эффектов виротерапии также изучается. Например, способность вируса осповакцины ингибировать РНК-зависимую протеинкиназу может усилить онколитическое действие ВВС, репродукцию которого эта протеинкиназа ограничивает. Было показано, что совместное заражение вирусом осповакцины и ВВС значительно увеличивает синтез белков ВВС в мышинной клеточной линии L даже в присутствии интерферона [135]. Для опухолевых клеточных линий толстой кишки HT29, яичников SKOV-3, и почек 786-O, которые резистентны к ВВС из-за интактных интерфероновых путей, были получены аналогичные результаты - вирус осповакцины позволял штамму VSV-ΔM51 эффективно инфицировать данные клеточные линии. Более того, комбинированная терапия значительно продлевала выживаемость мышей с подкожными ксенотрансплантатами аденокарциномы толстой кишки HT29 и карциномой молочной железы 4T1 в сравнении с монотерапией одним из вирусов [136]. Описаны клинические случаи применения нескольких ОВ. Например, 40-летняя пациентка с раком молочной железы 3 стадии, с двумя метастазами в легкие лечилась препаратами трастузумаб и тамоксифен, а также смесью ОВ, таких как вирус болезни Ньюкасла, реовирус, вирус осповакцины, вирус эпидемического паротита, ВВС и парвовирус H1 [137]. Благодаря лечению была достигнута полная ремиссия заболевания, которая подтвердилась проведенным рентгенологическим исследованием. Гипериммунная реакция в сочетании с лизирующим действием вируса не только способствовали регрессу основной массы опухоли, но также и элиминации метастазов. Лечение

хорошо переносилось, сохранялось хорошее качество жизни в течение всего курса терапии, госпитализации не требовалось [137]. Другая женщина-вирусолог с рецидивом трижды негативного рака молочной железы самостоятельно провела 7 внутриопухолевых инъекций вакцинного штамма Эдмонстон-Загреб вируса кори и 3 инъекции штамма Индиана BBC. Всего через два месяца терапии размер опухоли значительно уменьшился от исходного объема $2,47 \pm 0,06 \text{ см}^3$ до $0,91 \text{ см}^3$, после чего опухоль была удалена хирургически. При исследовании удаленной опухоли в ней наблюдались сильная инфильтрация CD20+, CD8+ лимфоцитами и макрофагами, а также наличие экспрессии PD-L1, в отличие от исходного PD-L1-негативного фенотипа. Пациентка не испытывала каких-либо серьезных побочных эффектов в ходе терапии, за исключением виремии после первого применения BBC в виде лихорадки и озноба с полным выздоровлением в течение следующих трех дней. Пациентка дополнительно прошла курс терапии трастузумабом после операции и по прошествии 45 месяцев после операции рецидива не наблюдалось [138]. В совокупности эти исследования подтверждают перспективность совместного использования BBC с другими ОВ.

1.3 Характеристика семейства *Picornaviridae*

1.3.1 Описание и жизненный цикл

Род *Enterovirus* относится к семейству *Picornaviridae*. Энтеровирусы человека вызывают широкий спектр заболеваний — от лёгких инфекций с разнообразной клинической симптоматикой до таких состояний, как герпангина, асептический менингит и миокардит, а также поражения ЦНС, включая энцефалит, менингит и полиомиелит.

Вирионы представлены капсидом икосаэдрической формы, состоящим из трех поверхностных белков VP1, VP2, VP3, которые находятся на внешней поверхности вируса, и более короткого белка VP4, который расположен на внутренней поверхности капсида. Капсидные белки опосредуют инициацию инфекции путем связывания с рецептором на мембране хозяина [139]. Рецепторы

для проникновения у энтеровирусов зачастую уникальны и включают интегрины, сиаловые кислоты, ICAM-1 и др. Кроме того, для проникновения полиовируса необходим рецептор PVR (poliovirus receptor) [140]. После взаимодействия вируса с клеточными рецепторами происходит эндоцитоз и реорганизация капсидных белков с высвобождением VP4, который образует пору в эндосомальной мембране и опосредует выход инфекционной РНК в цитоплазму. РНК энтеровирусов является одноцепочечной, положительной полярности, длиной 7200-8500 нт, с одной рамкой считывания, содержащей Поли(А)-хвост на 3'-конце и небольшой белок VPg на 5'-конце, а в нетранслируемой области на 5'-конце - РНК вторичной структуры (сайт посадки рибосомы, internal ribosome entry site, IRES IV типа) (Рисунок 4). Трансляция, происходящая в цитоплазме, начинается с удаления белка VPg с РНК, инициация синтеза белка стимулируется IRES, процесс заканчивается образованием полипротеина-предшественника, который далее расщепляется в основном вирусной химотрипсин-подобной цистеиновой протеазой. Репликация генома происходит в вирусных фабриках - двойных мембранных везикулах из ЭПР. Праймером для синтеза как положительных, так и отрицательных РНК является белок VPg. Перед началом синтеза два остатка уридина ковалентно связываются с тирозином в VPg, образуя комплекс VPgpUpU, который 3D-полимераза использует как праймер для синтеза РНК [139]. После образования новых РНК происходит их упаковка в прокапсиды с неразрезанными белками VP2-VP4, которые затем разрезаются с образованием зрелого капсида. Для большинства энтеровирусов характерен выход из клеток путем лизиса [139].

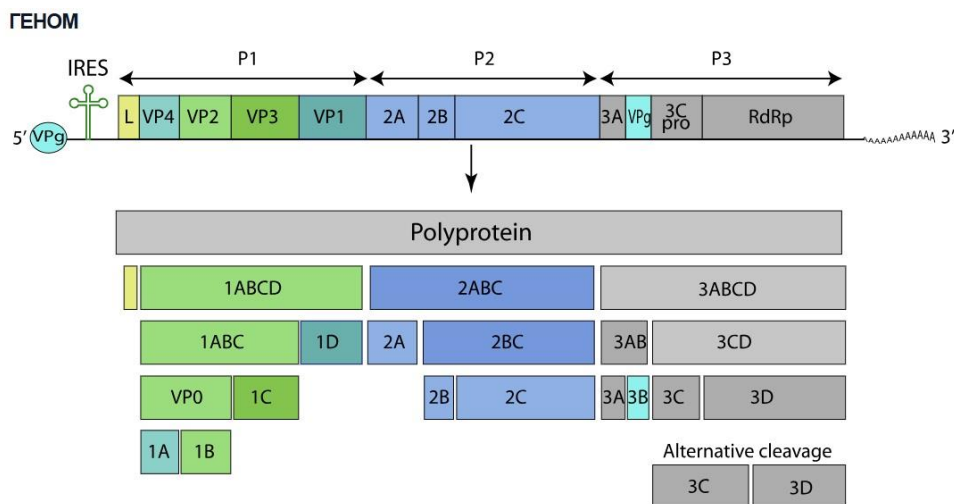


Рисунок 4 - Геном рода *Enterovirus*. Одноцепочечный РНК-геном положительной полярности, длиной 7,1-8,9 кб, полиаденилированный, состоящий из одной открытой рамки считывания, кодирующей полипротеин. На своем 5'-конце вирусная геномная РНК имеет вирусный белок (VPg). Длинная нетранслируемая область на 5'-конце содержит IRES. Область P1 кодирует структурные полипептиды, а P2 и P3 - неструктурные белки. Более короткая 3' нетранслируемая область играет важную роль в синтезе (-) цепи (адаптировано по: ViralZone [141])

1.3.2 Онколитические свойства полиовируса

Несмотря на то, что пикорнавирусы не являются объектами нашего исследования, мы оценивали онколитические свойства полиовируса для сравнительной характеристики с ВЖЛ и ВКЭ (см. главу 3). Исходя из этого, мы считаем необходимым привести краткий обзор исследований его онколитической активности.

Аттенуированный полиовирус 1 типа (штамм Сэбина) в онколитической терапии изучали одним из первых. Уже в 1960-х годах было показано, что он вызывает некроз и регрессию опухолевых клеток HeLa у морских свинок без каких-либо заметных побочных эффектов [142]. Особый интерес к полиовирусу в онковиротерапии возник из-за его способности проникать в клетки, используя рецептор CD155/PVR, который часто сверхэкспрессируется на опухолевых клетках различной этиологии. Так, штамм Сэбина 1 типа был протестирован на клеточных линиях костной саркомы и в ксенотрансплантатах остеосаркомы, экспрессирующих умеренные и высокие уровни CD155. Практически все клеточные линии погибали дозозависимым апоптозом, а у мышей с ксенотрансплантатами саркомы HT1080

после трехкратного введения вируса наблюдалось ингибирование роста опухоли на 40% [143].

Однако на сегодняшний день наиболее перспективным онколитическим агентом является не классический штамм Сэбина 1 типа, а рекомбинантный вирус на его основе PVSRIPO, в котором IRES полиовируса заменен на IRES из человеческого риновируса 2 типа для ограничения потенциальной нейровирулентности. PVSRIPO продемонстрировал онколитическое действие на широком спектре опухолевых клеточных линий, включая глиомы [144; 145], глиобластомы [146], рак молочной железы [147; 148] меланомы [149], а также рак предстательной железы [148]. Наибольшего успеха PVSRIPO в качестве онколитического агента достиг в отношении глиом, в частности, глиобластомы. Так, при заражении первичных культур глиомы *ex vivo*, полученных от пациентов, наблюдалась полная гибель культуры клеток через 12 часов [144], а при внутриопухолевом введении бестимусным мышам с глиобластомой их медиана выживаемости увеличилась на 187,5% и 200% в зависимости от дозы введения по сравнению с контрольной группой [146]. Также были проведены испытания *in vivo* на бестимусных мышах с ксенотрансплантатами глиомы U-118, где при дозе введения 10^8 ЦПД₅₀/мл размер опухолей уменьшился на 45% уже через 10 дней, а через 18 дней опухоли практически полностью регрессировали у всех животных [145]. Далее перед началом клинических испытаний вирус был протестирован на приматах на предмет его безопасности. Введение макакам PVSRIPO в дозах 10^7 , 10^9 и $5 \cdot 10^9$ ЦПД₅₀/мл не дало побочных эффектов, вирус не выделялся из сыворотки крови, слюны, мочи или фекалий инфицированных животных, однако обнаруживался в мозге всех макак, и, в единичном случае, в спинном мозге [150]. Эти исследования позволили перейти к клиническим испытаниям на людях, где в испытаниях I фазы была показана безопасность и отсутствие нейровирулентных свойств. Также данные показывают, что выживаемость пациентов с глиобластомой при введении препарата в дозе 10^7 ЦПД₅₀/мл через 36 месяцев составила 21%, что выше в сравнении с исторической контрольной группой, где данный показатель составляет 4%. На основе этих исследований управление по санитарному надзору

за качеством пищевых продуктов и медикаментов США присвоило PVSRIP0 статус прорывной терапии и на данный момент проводятся испытания II фазы клинических исследований [151].

Помимо успеха PVSRIP0 для лечения глиобластомы, есть обнадеживающие результаты в отношении других опухолей мозга. Например, вирус оценивали на модели церебрального метастатического рака молочной железы, используя клеточную линию MCF-7/HER2-18, которая, в отличие от других типов рака молочной железы, в высокой степени экспрессирует CD155. Клетки MCF-7/HER2-18 вводили интратекально и интракраниально бестимусным крысам с последующим лечением PVSRIP0 в дозе 10^7 и 10^9 ЦПД₅₀/мл. Медиана выживаемости после терапии при интратекальном введении была выше на 130% по сравнению с контрольной группой без существенной разницы в дозе. При интракраниальном введении различие между введенными дозами вируса было более выраженным: низкая доза увеличивала медиану выживаемости на 122%, а высокая доза - на 153% [147]. В других исследованиях на мышах Nude с ортотопическими ксенотрансплантатами рака груди SUM149 и подкожными ксенотрансплантатами опухоли предстательной железы DU145 внутриопухолевая инъекция в дозе 10^8 ЦПД₅₀/мл уменьшала объем опухоли или приводила к полному регрессу ксенотрансплантов. Также в результате терапии наблюдались инфильтрация опухоли нейтрофилами и увеличение уровней провоспалительных цитокинов [148].

Таким образом, полиовирус, особенно его модифицированная форма PVSRIP0, демонстрирует значительный потенциал в качестве онколитического агента, что подтверждается успешными результатами доклинических и клинических исследований. Важно отметить, что вирус продемонстрировал свою эффективность на опухолевых клеточных линиях различной этиологии, что обосновывает его выбор в качестве вируса-сравнения в данном исследовании.

1.4 Характеристика протоковой аденокарциномы поджелудочной железы

Несмотря на значительное улучшение показателей выживаемости при многих видах опухолей, рак поджелудочной железы по-прежнему остается высоколетальным. Как правило, пациенты с данным диагнозом живут не более 5 лет из-за поздней диагностики и трудностей лечения. Если раннее хирургическое вмешательство может значительно продлить выживаемость пациента с локализованной опухолью, то для пациентов с метастазами, как правило, прогноз неутешительный. Протоковая аденокарцинома и ее варианты составляют 90% всех карцином поджелудочной железы [152]. В основе высокой злокачественности PDAC лежит целый комплекс молекулярных нарушений. Важным фактором является эпителиально-мезенхимальный переход (epithelial to mesenchymal transition (EMT)), где мезенхимальный фенотип опухоли обеспечивает резистентность к апоптозу, содействует повышению количества опухолевых стволовых клеток (Cancer Stem Cells (CSC)), которые способствуют метастазированию и обеспечивают резистентность к химиотерапии [153]. Помимо этого, ключевую роль в процессах, связанных с прогрессированием PDAC, таких как метастазирование, резистентность к химиотерапии и повышение CSC, играет сверхэкспрессия определенных микроРНК [154]. Например, miR-301 вызывает резистентность к гемцитабину [155], а miR-296-5p приводит к подавлению регулирующего апоптоз гена BOK (Bcl2 related ovarian killer), способствует инвазии опухоли и лекарственной устойчивости [154]. Более 90% PDAC имеет мутацию в гене K-Ras. В нормальных условиях белок K-Ras участвует в регуляции деления клеток и способен переключаться между активной и неактивной формой. Из-за мутаций в K-Ras белок находится постоянно в активном состоянии, благодаря чему усиливает пролиферацию опухолевых клеток [156]. Мутантный K-Ras регулирует множество сигнальных путей, включая активность фосфоинозитид-3-киназы ((phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)) и митоген-активируемой протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase (MAPK)). PI3K активируется в

ответ на сигналы от факторов роста и цитокинов через рецепторные тирозинкиназы и регулирует внутриклеточные сигналы, контролируя различные онкогенные функции. Сложная сеть сигналов PI3K также действует как центральный узел для активации путей mTOR (mammalian target of rapamycin), NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 beta), p27 и Bad-Bax, которые, в свою очередь, регулируют различные аспекты выживания, роста, подвижности и метаболизма опухолевых клеток. Увеличение активации сигнального пути PI3K вносит существенный вклад в прогрессирование PDAC и связано с плохой выживаемостью пациентов [157]. MAPK отвечает за внутриклеточную систему сигналов, связанных с различными клеточными событиями, включая пролиферацию, дифференцировку, трансформацию. Активность MAPK зачастую связана со злокачественным фенотипом PDAC [158; 159].

Также при развитии аденокарциномы протоков поджелудочной железы наблюдаются мутации в генах-супрессорах опухолей, таких как P16/CDKN2A, TP53 и SMAD4/DPC4. Инактивация этих генов приводит к нарушению регуляции клеточного цикла (P16/CDKN2A), подавлению апоптоза (TP53) и нарушению регуляции трансформирующего фактора роста- β [160]. Интересно, что в PDAC, в отличие от других типов опухолей, зачастую не наблюдается повышенная васкуляризация, из-за чего внутри опухоли присутствует постоянная гипоксия, при этом наличие гипоксии зачастую коррелирует с прогрессированием опухоли. В ответ на отсутствие кислорода активируются HIF, которые действуют как опухолевые промоторы. HIF участвуют в окислительно-восстановительном гомеостазе, активации аутофагии и эпигенетической регуляции. Помимо этого, изменения в HIF-зависимом сигнальном пути при гипоксии приводят к неоваскуляризации, которая в конечном итоге приводит к инвазии опухоли [161]. Как и в других типах опухолей, клетки аденокарциномы протоков поджелудочной железы сверхэкспрессируют факторы роста и их лиганды, такие как эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor (EGF)), фактор роста фибробластов, инсулиноподобный фактор роста и др. Эти факторы играют важную

роль в выживаемости опухолевых клеток, способствуют инвазии и метастазированию [160]. Понимание этих молекулярных механизмов имеет важное значение для разработки новых подходов к лечению PDAC. Выявление ключевых факторов, участвующих в развитии и прогрессировании опухоли, может стать основой для создания таргетной терапии, направленной на конкретные молекулярные мишени. На сегодняшний день хирургическое вмешательство является единственным способом излечить PDAC, хотя только у 10 - 20% пациентов заболевание имеет очевидную резектабельность, и даже после операции результаты неутешительны: медиана выживаемости составляет 15 - 20 месяцев, а 5-летняя выживаемость – 8 - 15% из-за высокой частоты рецидивов. Поэтому зачастую используют сочетание хирургии и адъювантной терапии, которая включает лучевую терапию, химиотерапию гемцитабином, mFOLFIRINOX (комбинированная терапия фторурацилом, фолиновой кислотой, иринотеканом и оксалиплатином), что в последнем случае увеличивает общую выживаемость до 54 месяцев [162]. Помимо классических методов лечения, перспективным кажется использование также ОБ. Некоторые из них активно исследуются и показывают свою эффективность против PDAC. На данный момент на стадии клинических испытаний находятся различные варианты аденовирусов, ВПГ-1, реовируса, парвовируса, вируса осповакцины [163]. Однако, несмотря на активную разработку новых методов лечения, прорывных результатов в лечении аденокарциномы протоков поджелудочной железы пока не наблюдается.

1.5 Характеристика глиобластомы

Глиобластома является наиболее распространенным типом первичного рака мозга у взрослых и остается одним из самых агрессивных и неизлечимых злокачественных новообразований. Она может возникнуть в любой части ЦНС, но чаще всего локализуется в лобной или височной долях. По классификации Всемирной организации здравоохранения глиобластома — это диффузная астроцитома IV степени, которая является высокозлокачественным подтипом с высокими показателями клеточного деления и сосудистой пролиферации [164].

Глиобластома относится к гетерогенной группе опухолей мозга - глиомам, и, предположительно, происходит из глиальных клеток или их предшественников [164]. Как и при PDAC, в патогенезе глиом присутствует аномальная активация сигнальных путей факторов роста, таких как EGF, фактор роста эндотелия сосудов, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, которыми и опосредуется пролиферация опухолевых клеток [165]. Для глиом низкой степени злокачественности характерны мутации в p53, повышенная экспрессия тромбоцитарного фактора роста- α и его рецептора. Рецидивируют глиомы, как правило, с прогрессированием степени злокачественности, которое связано с нарушением работы генов-супрессоров опухолей RB, p16/CDKN α A и 19q [166].

Глиобластома по клинической форме бывает первичная и вторичная. К первичной форме относится около 95% случаев, и обычно она возникает *de novo* у пожилых пациентов. Вторичная форма появляется из предшествующих астроцитом, как правило, у молодых пациентов [167]. Среди молекулярных отличий этих форм можно отметить то, что первичная глиобластома зачастую имеет повышенную экспрессию мутированного рецептора EGF, в то время как опухолевые клетки вторичной глиобластомы активно пролиферируют благодаря мутированному тромбоцитарному фактору роста. Помимо этого, в первичной глиобластоме обычно наблюдается высокая экспрессия гена MDM2, который является ингибитором p53, а также присутствуют мутации в генах-супрессорах опухолей PTEN и CDKN2A, тогда как вторичная глиобластома обычно характеризуется мутациями в генах p53, IDH1, RB, сверхэкспрессией тирозинкиназного рецептора MET и рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа PDGFR α . Обе формы имеют повышенную активность тирозинкиназного рецептора, который активирует пути RAS и PI3K. Все эти изменения приводят к аномальному функционированию сигнальных путей факторов роста и клеточного цикла, что приводит к повышенной пролиферации клеток, опухолевой инвазии, неоангиогенезу и ингибированию апоптоза [166]. Также молекулярные характеристики глиобластомы включают высокую внутриопухолевую гетерогенность, иммуносупрессивную микросреду, наличие стволоподобных

клеток, называемых стволовыми клетками глиомы. Однако первичная и вторичная формы глиобластомы демонстрируют некоторые молекулярные различия. Ответ на терапию у них примерно одинаков: медиана общей выживаемости составляет от 14,6 до 20,5 месяцев, при этом менее 5% пациентов выживают в течение пяти лет после постановки диагноза [168]. В настоящее время стандартным лечением является максимальная хирургическая резекция, при этом полная резекция опухоли невозможна из-за инвазии в окружающие ткани. Далее в ходе лечения используют лучевую терапию и химиотерапию, как правило, темозоломидом или кармустином. Также разрабатываются терапевтические агенты, нацеленные на молекулярные особенности глиобластомы, такие как ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, рецептора EGF, белков RAS, пути PI3K, ангиогенеза и др. [169]. ОВ в отношении глиобластомы являются перспективным методом лечения, среди них различные варианты ВПГ-1, аденовирусы, вирус осповакцины, ВВС, полиовирус и др. [168]. Помимо вирусов, которые только проходят клинические испытания, для лечения глиом на территории Японии уже в 2021 году был зарегистрирован препарат Teserpaturev/G47Δ на основе ВПГ-1. В клинических испытаниях II фазы показатель выживаемости в течение 1 года после начала терапии Teserpaturev/G47Δ составил 92,3%, в то время как в исторической контрольной группе этот показатель составляет 15%. Через 3 года после лечения выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость составила 4,7 и 20,2 месяцев соответственно. На данный момент Teserpaturev используют в комбинированной терапии [5].

ОВ показали свою перспективность в лечении опухолей различной этиологии. Однако для лечения PDAC и глиобластомы все еще требуется поиск новых лекарственных средств. Таким образом, изучение онколитической активности флавивирусов и поиск комбинированных методик лечения является перспективной задачей.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы, использованные в работе

2.1.1 Реактивы

В работе были использованы реактивы отечественного и зарубежного производства:

1. ПанЭко (Россия): питательные среды DMEM и DMEM-F12, фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline (PBS)), антибиотики пенициллин-стрептомицин и гентамицин, L-глутамин, ДМСО, МТТ-реагент, бычий сывороточный альбумин, раствор 0,25% трипсин-ЭДТА, EGF, добавки G5 и НейроМакс;
2. ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт Полиомиелита) (Москва, Россия): питательные среды DMEM, ИглаМем, 199 с солями Эрла и Хэнкса, L-глутамин, растворы Версена 0,02% и Трипсина 0,25%;
3. Gibco (США): среда FluoroBrite™ DMEM, эмбриональная телячья сыворотка (Fetal Bovine Serum (FBS));
4. АмплиСенс (Россия): наборы реагентов для проведения ПЦР «АмплиСенс TBЕV, B. burgdorferi sl, A. phagocytophillum, E. chaffeensis / E. muris-FL», «АмплиСенс Yellow fever virus-FL», «Рибо-преп», «Реверта-L»;
5. Евроген (Россия): набор реагентов для проведения ПЦР Мусо Real-Time;
6. Sigma-Aldrich (США): метилцеллюлоза, агароза, ДМСО, кристаллический фиолетовый, формалин 37%, КОН;
7. Lumiprobe (Россия): Cyanine5 NHS-эфир, липофильный мембранный трейсер DiD.

2.1.2 Питательные среды

Для проведения экспериментов с клеточными культурами в основной части работы были использованы питательные среды следующего состава:

1. среда для культивирования DMEM: питательная среда DMEM с добавлением 2 mM L-глутамина, антибиотиков пенициллина (250 ME/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки;
2. среда для культивирования ИглаМем: питательная среда ИглаМем с 2 mM L-глутамина, антибиотиками пенициллин (250 ME/мл) и стрептомицин (200 мкг/мл) и 2% FBS.

2.1.3 Клеточные линии

В работе использовали клеточные линии, полученные из разных источников:

1. ATCC (США): глиобластома человека LN-229, мультиформная глиобластома человека T98G, клетки почки африканской зеленой мартышки Vero;
2. Коллекция ИБХ РАН (Россия): карцинома легкого человека A549, аденокарцинома молочной железы человека MCF7, аденокарцинома молочной железы человека MDA-MB-231, карцинома поджелудочной железы человека MIAPaCa-2, карцинома протоков поджелудочной железы человека PANC-1, аденокарцинома поджелудочной железы мыши Pan02, глиома мыши GL-261, нейробластома человека Kelly, нейробластома человека SH-SY5Y, почек эмбриона свиньи СПЭВ;
3. Коллекция ИБР РАН (Россия): карцинома толстой кишки человека HCT-116, карцинома толстой кишки мыши C-26, аденокарцинома толстой кишки человека SW620, аденокарцинома поджелудочной железы человека CAPAN-2;
4. ФГБУН ИМБ РАН (Россия): глиобластома человека GL6.

Клеточные линии регулярно проверяли на контаминацию микоплазмой с помощью набора для обнаружения ДНК микоплазмы Myco Real-Time (Евроген).

2.1.4 Вирусы

В работе использовали вирусы из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт Полиомиелита): штамм 17D вируса желтой лихорадки,

штамм Софьин вируса клещевого энцефалита, штамм Индиана вируса везикулярного стоматита, штамм Сэбина вируса полиомиелита 1 типа.

1.1.5 Лабораторные животные

В работе использовали самок мышей линии C57BL/6 в возрасте от шести до восьми недель, приобретенные в SPF-виварии Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск, Россия.

2.2. Культивирование клеточных линий и вирусов

2.2.1 Хранение и культивирование клеточных линий

Клеточные линии хранили в холодильнике при -80°C или при -196°C в жидком азоте. Размораживание производили при 37°C с последующим центрифугированием при 1200 об/мин в течение 3 минут, далее отделяли супернатант от клеточной взвеси. Клетки ресуспендировали в среде для культивирования DMEM, переносили в культуральный флакон и культивировали в среде для культивирования DMEM в атмосфере 5% CO_2 при 37°C до достижения клетками монослоя на 2-3 сутки.

При пассировании клеточной культуры, клетки промывали раствором Версена 0,02%, с последующим инкубированием при 37°C с раствором Трипсин-Версен в соотношении 1:1 для снятия клеточной культуры с поверхности культурального флакона. После открепления клеток к ним добавляли среду для культивирования DMEM в соотношении трипсин-версен/среда 1:3. Далее клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 3 минут, удаляли супернатант, ресуспендировали в среде для культивирования DMEM и переносили в новый культуральный флакон. В случае использования клеточной линии Саран-2 для открепления клеток с поверхности флакона использовали 0,25% трипсин-ЭДТА.

1.1.5 Получение 3D-тканевых сфероидов

Тканевые сфероиды формировали с использованием агарозных форм, созданных с использованием силиконовых матриц согласно инструкции, предоставленной производителем (Лаборатория биотехнологических исследований 3D Bioprinting Solutions, Москва, Россия). Для создания агарозной формы 2 г агарозы растворяли в 100 мл PBS, затем полученный раствор наносили на силиконовые матрицы. После застывания агара полученную агарозную форму переносили в чашку петри или 6-луночный планшет, содержащий среду для культивирования DMEM, и выдерживали в течение 20 минут при 37°C. В это время интересующую клеточную культуру снимали, а затем рассаживали в агарозные формы в количестве 10^6 клеток/форма (MIAPaCa-2) или 10^7 клеток/форма (LN-229 и T98G) и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C. Через сутки формировались тканевые сфероиды.

2.2.3 Получение перививаемых культур астроцитомы

Образцы опухолевой ткани были получены из послеоперационного материала от пациентов в рамках сотрудничества с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальным медицинским исследовательским центром радиологии» Министерства здравоохранения России (ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России). Все пациенты предварительно подписывали добровольное информированное согласие на лечебную (диагностическую) манипуляцию (процедуру) (приложение А). Изначально образцы опухолевой ткани забирали в стерильные пробирки, заполненные средой DMEM. Для получения клеточной суспензии опухоли измельчали с помощью одноразовых культуральных нейлоновых сеток с размером пор 40 микрон, затем полученную суспензию промывали в PBS тройным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин, суспендировали в ростовой среде и аккуратно пипетировали до получения гомогенной взвеси частиц, содержащих отдельные клетки или их агрегаты. В качестве ростовой среды использовали 2 среды различного состава: DMEM-F12 с

добавлением 2 мМ L-глутамина, антибиотиков пенициллина (250 МЕ/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки, а также DMEM-F12 с аналогичными добавками и с добавлением 0,0025% EGF, 1% G5, 2% нейромакс. Культивирование проводили на 6-луночной планшете в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. В последующем при пассировании культур использовали среду DMEM-F12 с добавлением 2 мМ L-глутамина, антибиотиков пенициллина (250 МЕ/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки или среду для культивирования DMEM.

2.2.4 Хранение и культивирование вирусов

Для культивирования ВЖЛ, ВВС и полиовируса использовали клеточную линию Vero. Для культивирования ВКЭ использовали клеточную линию СПЭВ. Для заражения клеточных линий использовали следующие титры вирусов: ВВС - 10⁷ ЦПД₅₀/мл, полиовирус - 10⁶ ЦПД₅₀/мл, ВЖЛ и ВКЭ - 10⁷ БОЕ/мл.

Монослой клеток промывали бессывороточной средой ИглаМем, затем вносили во флаконы вирусосодержащую жидкость в объеме, необходимом для покрытия дна культурального флакона. Инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C в течение 1 часа при периодическом окатывании клеточного монослоя вирусосодержащей жидкостью. Затем во флаконы добавляли среду для культивирования ИглаМем. Клеточную линию с вирусом инкубировали в 5% CO₂ при температуре 37°C в течение 2-5 суток до достижения ЦПД, оцениваемого в два-три креста (см. раздел 2.4.1.), после чего собирали вирусосодержащую жидкость и хранили в морозильной камере при температуре -80°C.

2.3 Титрование вирусов

2.3.1 Титрование вирусов по методу Рида-Менча

Титрование по методу Рида-Менча проводили для ВВС и полиовируса на клеточной линии Vero [170]. Изначально клетки культивировали в среде для культивирования DMEM на 96-луночной планшете в количестве 10⁵ вносимых

клеток на лунку. Через сутки клетки достигали монослоя. Вирус разводили последовательными 10-кратными разбавлениями до 10^{-9} степени в среде для культивирования ИглаМем. Полученные разведения вносили по 100 мкл в каждый ряд 96-луночного планшета с монослоем Vero, а в контрольные ряды вносили среду для культивирования ИглаМем. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C . Через трое суток с помощью световой микроскопии проводили визуальную оценку состояния монослоя и оценивали ЦПД, далее производили расчет титра вируса по формуле Рида-Менча (1).

$$\lg \text{ЦПД}_{50} = \lg B \frac{b-50}{b-a} \lg d, \quad (1)$$

где ЦПД₅₀ - искомое разведение вируса;

B - разведение, дающее цитопатический эффект более 50%;

b - процент, соответствующий разведению B;

a - процент, соответствующий разведению, дающему цитопатический эффект менее 50%;

d - коэффициент разведения.

2.3.2 Титрование вирусов методом бляшкообразования

Титры ВЖЛ и ВКЭ определяли методом бляшек под покрытием 1,26% метилцеллюлозы. Для ВЖЛ использовали клеточную линию Vero, для ВКЭ - СПЭВ. Клетки высевали на 12-луночные планшеты в количестве 10^6 клеток на лунку. Через сутки формировался клеточный монослой, который использовали для титрования. На среде 199 готовили десятикратные разведения вирусных образцов и добавляли их к клеткам в объеме 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C в течение 1 часа при периодическом окатывании клеточного монослоя вирусосодержащей жидкостью. Затем в каждую лунку вносили 1 мл 1,26% метилцеллюлозы в среде 199 с солями Эрла и Хэнкса в соотношении 2:1 с добавлением 0,1% гентамицина и 2% FBS. Далее планшеты инкубировали в течение семи суток в атмосфере 5% CO_2 при 37°C . На восьмой день

панель дважды промывали PBS и выдерживали с 96% этиловым спиртом в течение часа. Затем панель проявляли 0,1% кристаллическим фиолетовым.

Количество бляшек подсчитывали в каждом разведении для определения количества бляшкообразующих единиц на мл (БОЕ/мл). Титр рассчитывали по формуле (2):

$$\Sigma N / (d * n * V) = \text{БОЕ/мл}, \quad (2)$$

где N - количество бляшек в одной лунке для соответствующего разведения;

n - количество лунок для одного разведения, шт;

V - объем пробы (дозы для заражения), мл;

d - разведение (в виде 10^{-x}).

2.4. Определение чувствительности клеточных линий к вирусам

2.4.1 Оценка жизнеспособности клеток по цитопатогенному действию

Клетки высевали в культуральные флаконы площадью 25 см² в количестве 10⁶ клеток на флакон для медленнорастущих культур (LN-229, T98G, GL6, GL-261, SW620, Саран-2) и 10⁵ клеток на флакон для быстрорастущих культур (HCT 116, Kelly, SH-SY5Y, A549, MDA-MB-231, MCF7, MIAPaCa-2, PANC-1, Pan02, C-26) и культивировали в среде для культивирования DMEM в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. После формирования монослоя (1-2-е сутки, в случае Саран-2 - 7 сутки) клетки заражали вирусосодержащей жидкостью с множественностью заражения (multiplicity of infection (MOI)) равной 1 и культивировали в среде для культивирования DMEM (T98G, Pan02, GL-261, C-26, SW620, HCT 116, Саран-2, Kelly, SH-SY5Y) и в среде для культивирования ИглаМем (LN-229, GL6, MDA-MB-231, MCF7, A549, MIAPaCa-2, PANC-1) в течение 5-10 суток.

Начиная с третьих суток с помощью световой микроскопии оценивали цитопатический эффект. Учет ЦПД проводили визуально по системе крестов: если изменению (по сравнению с контролем) подвергся весь монослой в матрасе, то

ЦПД оценивали на 4 креста (++++), если $\frac{3}{4}$ - на три (+++), если $\frac{1}{2}$ - на два (++) , если на $\frac{1}{4}$ - на один крест (+).

2.4.2 Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ-теста

Опухолевые клеточные линии высевали на 96 луночный планшет в количестве 10^5 клеток на лунку для медленнорастущих культур и 10^4 клеток на лунку для быстрорастущих культур и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в среде для культивирования DMEM. После достижения клетками конfluence 70-90% на 1-2-е сутки, а в случае Саран-2 - 7 сутки, проводили заражение 10-кратными серийными разведениями вируса в бессывороточной среде ИглаМем или DMEM в восьми повторах. Вирусные разведения вносили в объеме 30 мкл на лунку, инкубацию вируса с клетками проводили в течение 1 часа в атмосфере 5% CO₂ при 37°C, далее удаляли вирусосодержащую жидкость, промывали клетки бессывороточной средой и культивировали в среде для культивирования DMEM или в среде для культивирования ИглаМем в зависимости от чувствительности культуры к питательной среде. Через 3, 5, 7 суток определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста, используя реагент МТТ в рабочей концентрации 5 мг/мл в PBS с pH=7,2. Для этого в среду для культивирования добавляли МТТ реагент в количестве 10 мкл на лунку и инкубировали 3 часа в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Затем среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО. С помощью планшетного ридера Bio-Rad iMark (Bio-Rad, США) определяли оптическую плотность при длине волны 595/650 нм. Результат оценивали в сравнении со средней оптической плотностью в контроле (неинфицированные клетки), принимая ее за 100%.

2.4.3 Оценка вирусного цитопатогенного действия на 3D-тканевых сфероидях

Сфероиды помещали в 24-луночные планшеты по 1-2 сфероида на лунку и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C в среде для

культивирования DMEM. Через сутки сфероиды прикреплялись к дну планшета, и к ним добавляли 1 мл вируса в среде для культивирования DMEM в титре 10^5 ЦПД₅₀/мл для ВВС и 10^6 БОЕ/мл для ВЖЛ. Затем с использованием светового микроскопа в течение пяти дней проводили визуальную оценку цитопатического действия вирусов на сфероиды.

2.4.4 Микроскопия

Визуальный осмотр, фотографии клеток и сфероидов осуществляли с помощью инвертированного биологического микроскопа OLYMPUS CKX53 (Olympus Corporation, Япония), оснащенного цифровой камерой и программным обеспечением ADFImageCapture версии 4.11.21522.20221011.

2.4.5 Использование системы прижизненного мониторинга клеточной пролиферации xCELLigence Real-Time Cell Proliferation Measurement

Прижизненный мониторинг за пролиферацией и гибелью клеток осуществляли с помощью xCELLigence Agilent's Real-Time Cell Analysis (Agilent Technologies, США). Регистрацию сигнала производили в первые сутки с шагом 2 ч, последующие дни - 4 ч. С использованием программного обеспечения RTCA Pro Software осуществляли анализ данных с выводом средней кривой по лункам ($n=8$) и погрешностей стандартного отклонения.

Для получения кривых пролиферации на планшеты E-Plate наносили $1,5 \cdot 10^5$ клеток на лунку M1ARaCa-2 в среде для культивирования DMEM и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Через сутки клетки достигали конfluence 70%. Клеточный слой заражали (или в случае контроля не заражали) ВЖЛ в бессывороточной среде ИглаМем в дозе 10^5 БОЕ/100 мкл, и через час проводили отмывку бессывороточной средой с последующим добавлением среды для культивирования ИглаМем. Инкубацию проводили в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение пяти суток.

В другом эксперименте клетки MIAPaCa-2, PANC-1, Pan02, Saran-2 в количестве 10^4 клеток на лунку смешивали с вирусом в дозе 10^6 БОЕ/100 мкл и наносили на планшеты в среде для культивирования DMEM, инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение пяти суток.

Монослой клеток Pan02 в культуральном флаконе 25 см² заражали (или в случае контроля не заражали) ВЖЛ в дозе 10^6 БОЕ/мл (MOI = 0,1). Заражение проводили аналогично оценке по ЦПД. Через трое суток культивирования измеряли количество открепившихся клеток в культуральной среде. Затем клеточный слой снимали, нормировали по количеству $1,5 \times 10^5$ клеток на лунку и высаживали на планшеты E-Plate (Agilent Technologies, США) в среде для культивирования DMEM. Клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение четырех суток. В аналогичном эксперименте также производили замену среды каждые 48 ч.

2.4.6 Анализ слияния вируса желтой лихорадки с клетками опухолевых линий PANC-1, MIAPaCa-2 и Pan02

Для получения вирионов, меченных DiD, предварительно проводили очистку ВЖЛ. Вирус культивировали, затем осветляли центрифугированием при параметрах 3500 об/мин, 4°C в течение 1 часа для удаления клеточного дебриса. Осветленную вирусосодержащую жидкость дважды ультрацентрифугировали в 20% сахарозе в PBS и в чистом PBS при 25000 об/мин, при температуре 4°C в течение 2,5 часов для очистки вируса от культуральной жидкости. Концентрированный вирус растворяли в 500 мкл PBS и титровали. Затем 1 мкл 0,1 мМ раствора 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндодикарбоцианина (LumiTraceDiD) в ДМСО смешивали с 10 мкл очищенного ВЖЛ (10^6 ЦПД₅₀/мл) в PBS. После пипетирования к смеси добавляли 305 мкл FluoroBriteDMEM. Те же манипуляции повторяли для инаktivированных 0,01% формалином вирионов ВЖЛ и использовали в качестве отрицательного инфекционного контроля. После пипетирования полученные смеси добавляли к клеткам PANC-1, MIAPaCa-2 и

Рап02 по 60 мкл на лунку в дублях и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Через 1,5 часа клетки визуализировали с применением флуоресцентного инвертированного микроскопа OLYMPUS CKX53 с увеличением 20×, кубом фильтра Cy5: Ex620/60, Em700.

2.4.7 Заражение опухолевым экссудатом клеточной линии Vero

Анализ проводили для оценки наличия инфекционного вируса в опухолевом экссудате, собранном от мышей с опухолями Рап02, получавших виротерапию ВЖЛ. Изначально опухоли забирали в пробирки с PBS и хранили в холодильнике при -80°C. После размораживания опухоли подвергали механическому измельчению с использованием стерильной ступки с пестиком, после чего центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 минут и отбирали супернатант. Полученный экссудат добавляли к суточному монослою клеточной линии Vero в 6-луночной планшете в объеме 300 мкл/лунка и выдерживали в течение часа при периодическом омывании клеточного монослоя опухолевым экссудатом. Затем добавляли питательную среду DMEM с 2 mM L-глутамина, антибиотиков пенициллина (250 ME/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл) и 0,1% альбумина и культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение пяти суток. В конце эксперимента культуральную жидкость собирали для определения РНК ВЖЛ методом ПЦР.

2.5 Определение РНК вирусов методом ПЦР в режиме реального времени

2.5.1 Сбор и хранение материалов для ПЦР

Культуральную жидкость с вирусами, собранную в ходе эксперимента от разных клеточных линий в объеме 1 мл, хранили в криопробирках при температуре -80°C. Перед выделением РНК вирусов клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин, собирали надосадочную жидкость.

Кровь от мышей забирали в микроцентрифужные пробирки, выдерживали в течение часа при комнатной температуре и центрифугировали на MiniSpin (Eppendorf Manufacturing Corporation, Германия) при параметрах: 13000 об/мин, 5 мин. Надосадочную жидкость (сыворотку) забирали и хранили в холодильнике при температуре -80°C .

Опухоли хранили в PBS при температуре -80°C . Перед использованием опухоли гомогенизировали растиранием в ступках с добавлением PBS. Полученные суспензии центрифугировали при параметрах: 13000 об/мин, 5 мин. Опухолевый экссудат забирали и использовали для выделения РНК.

2.5.2 Выделение РНК / получение кДНК

Выделение РНК вируса из полученного супернатанта, сыворотки крови или культуральной жидкости проводили с помощью набора реагентов «Рибо-преп» из 100 мкл материала, а обратную транскрипцию (получение кДНК) проводили с помощью набора «Реверта-L» согласно инструкции производителя.

2.5.3 Определение РНК вирусов методом ПЦР в режиме реального времени

Количественную ПЦР в режиме реального времени проводили на термическом циклере Rotor-Gene Q 6plex (Qiagen, Нидерланды) с использованием каналов детекции (FAM, HEX) и определением цикла детекции (Ct). Все действия совершали согласно инструкции производителя.

Для определения ВКЭ в пробах использовали набор реагентов «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis* / *E. muris-FL*» с применением калибраторов с известной концентрацией кДНК: 1×10^9 , 1×10^7 , 1×10^5 ГЭ/мл, предоставленных сотрудниками Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Для определения ВЖЛ использовали набор реагентов «АмплиСенс *Yellow fever virus-FL*». В качестве стандартов использовали предварительно выделенную РНК штамма 17D ВЖЛ в титрах 1×10^7 , 1×10^5 , 1×10^3 БОЕ/мл.

2.6 Оценка чувствительности клеточных линий глиобластомы человека к протопорфиру IX и вирусу везикулярного стоматита

2.6.1 Оценка чувствительности клеточных линий глиобластомы человека к протопорфиру IX

Протопорфирин IX растворяли в ДМСО в начальной концентрации 1 г/л, а последующие разведения протопорфирина IX готовили в PBS, содержащем не более 10% ДМСО. Растворы протопорфирина IX различных концентраций затем добавляли в шести повторах в 96-луночные планшеты с линией клеток T98G и LN-229, конфлюэнтностью 70-90%. В качестве контроля использовали PBS с 10% ДМСО. Через час инкубации в атмосфере 5% CO₂ при 37°C клетки либо облучали светом, длиной волны 450 нм (для определения фототоксичности), либо выдерживали в темноте (для определения темновой токсичности). Затем протопорфирин IX удаляли. Клеточные линии, обработанные протопорфирином IX и контрольным раствором, культивировали в среде для культивирования DMEM в течение суток, после чего их жизнеспособность определяли с помощью МТТ-теста.

2.6.2 Оценка чувствительности клеточных 3D-тканевых сфероидов глиобластомы человека к протопорфиру IX

Прикрепленные сфероиды в 24-луночной планшете (1-2 сфероида на лунку) обрабатывали протопорфирином IX в концентрации 10 мкг/мл в PBS (с 1% ДМСО) в 6 повторах. В качестве отрицательного контроля использовали PBS, содержащий 1% ДМСО. Через час инкубации в атмосфере 5% CO₂ при 37°C сфероиды облучали светом, длиной волны 450 нм. Затем протопорфирин IX и PBS удаляли, добавляли

среду для культивирования DMEM и инкубировали в течение 5 дней, ежедневно проводя визуальную оценку изменений.

2.6.3 Оценка чувствительности клеточных линий глиобластомы человека к комбинированной обработке протопорфирином IX и вирусом везикулярного стоматита

Разведения протопорфирина IX и ВВС готовили аналогично ранее описанному методу. В качестве контроля действия фотосенсибилизатора использовали раствор протопорфирина IX в концентрации 2 мкг/мл, в качестве контроля действия вируса - ВВС в дозе 10^3 и 10^4 ЦПД₅₀/мл, а в качестве контроля клеток - раствор PBS с 10% ДМСО. Исследуемые концентрации протопорфирина IX вносили в 96-луночные планшеты, содержащие клетки T98G и LN-229, конфлюэнтностью 70-90%. Через час инкубации в атмосфере 5% CO₂ при 37°C клетки облучали светом с длиной волны 450 нм. Затем протопорфирин IX и PBS удаляли. Далее линии клеток инфицировали 30 мкл ВВС в титрах 10^3 и 10^4 ЦПД₅₀/мл сразу после удаления протопорфирина IX или после инкубации клеток в среде для культивирования DMEM в течение суток. Клеточные линии с вирусом инкубировали в течение часа, после чего вирусосодержащую жидкость удаляли. Клетки промывали бессывороточной средой ИглаМем и культивировали в среде для культивирования DMEM. Через трое суток жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста.

2.6.4 Оценка чувствительности 3D-тканевых сфероидов к комбинированной обработке протопорфирином IX и вирусом везикулярного стоматита

Прикрепленные сфероиды в 24-луночной планшете (1-2 сфероида на лунку) обрабатывали протопорфирином IX в концентрации 10 мкг/мл в PBS, содержащем 1% ДМСО, в 6 повторах. После инкубации в течение часа сфероиды подвергали облучению светом, длиной волны 450 нм. Затем протопорфирин IX удаляли и добавляли ВВС в титре 10^5 ЦПД₅₀/мл в среде для культивирования DMEM.

Сфероиды инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 5 суток, проводя при этом визуальную оценку цитотоксических эффектов.

2.7 Методы получения комплексов вируса везикулярного стоматита

2.7.1 Осветление и концентрирование штамма Индиана вируса везикулярного стоматита

Полученную после культивирования вирусосодержащую жидкость центрифугировали при 3500 об/мин в течение 1 ч при 4 °C. Супернатант отделяли от клеточного дебриса и концентрировали ультрацентрифугированием на роторе SW28 (Beckman Coulter, США) при 25 000 об/мин в течение 2,5 ч при 4 °C. Концентрированный вирус растворяли в PBS с pH=8,2, а затем повторно ультрацентрифугировали на роторе SW55 (Beckman Coulter, США) при 35 000 об/мин в течение 2,5 ч при 4 °C. После этого концентрированный ВВС растворяли в 500 мкл PBS с pH=8,2. Для оценки потерь и конечного титра вируса ВВС титровали по методу Рида-Менча после проведения каждой манипуляции.

2.7.2 Получение комплекса ВВС-Cyanine5.5

Флуоресцентную метку Cyanine5.5 NHS-эфир (0,4 мг, 0,0055 ммоль) растворяли в 1 мл ДМСО. Затем 50 мкл полученного раствора добавляли к 500 мкл ВВС ($4 \cdot 10^9$ ЦПД₅₀/мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакционную смесь очищали ультрацентрифугированием на роторе SW55 при 35000 об/мин в течение 2,5 ч при 4°C, после чего комплекс растворяли в PBS и концентрировали с использованием центрифужного концентратора с размером пор 0,45 мкм при 7000 об/мин в течение 15 мин. В результате получали комплекс ВВС-Cyanine5.5. Для отрицательного контроля в последующем использовали растворенную метку Cyanine5.5 NHS-эфир, к которой добавляли 500 мкл PBS с pH=8,2, затем ультрацентрифугировали и концентрировали при тех же параметрах, что и комплекс. Полученный комплекс титровали по методу Рида-Менча.

2.7.3 Получение комплекса ВВС-протопорфирин IX

Раствор N-сукцинимидного эфира протопорфирина IX (300 мкл) в ДМСО с концентрацией 10 мкг/мл и 1,2 мл PBS с pH=8,3 добавляли к 500 мкл ВВС (10^8 ЦПД₅₀/мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 3 ч, а затем охлаждали до 4 °С, при этом непрореагировавший N-сукцинимидный эфир протопорфирина IX выпадал в осадок. Полученный комплекс от осадка отделяли с использованием центрифужного концентратора с размером пор 0,45 мкм при 7000 об/мин в течение 15 мин. Затем комплекс концентрировали на роторе SW55 при 35000 об/мин в течение 2,5 ч при 4°C, после чего растворяли в PBS и снова концентрировали с использованием центрифужного концентратора при 7000 об/мин в течение 15 мин. В результате получали комплекс ВВС-протопорфирин IX. Для отрицательного контроля использовали N-сукцинимидный эфир протопорфирина IX, прошедшего те же этапы очистки, что и комплекс ВВС-протопорфирин IX. Полученный комплекс титровали по методу Рида-Менча.

2.7.4 Флуоресцентная микроскопия

Полученными комплексами инфицировали 2 лунки 6-луночного планшета с клетками Vero, конфлюэнтностью 30 - 50%, в другие 2 лунки наносили полученные отрицательные контроли. Через час инкубации в атмосфере 5% CO₂ при 37°C растворы с комплексами удаляли, клетки трижды промывали PBS, затем добавляли среду FluoroBrite™ DMEM. Адсорбцию комплексов на поверхности клеток оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии на системе визуализации Celena X (Logos Biosystems, Корея) на канале Cy5 (650-690 нм).

2.7.5 Определение чувствительности культуры T98G к комплексу ВВС-протопорфирин IX

Монослой клеток T98G в 6-луночном планшете инфицировали полученным комплексом ВВС-протопорфирин IX и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C

в течение часа. После этого культуру клеток дважды промывали бессывороточной средой ИглаМем и добавляли среду для культивирования. Затем клетки облучали светом, длиной волны 450 нм и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение суток. Литическое действие комплекса оценивали с помощью инвертированного биологического микроскопа OLYMPUS CKX53.

2.8 Определение противоопухолевой активности штамма 17D вируса желтой лихорадки на сингенной модели Pan02

Опухолевые клетки Pan02 представляют собой хорошо зарекомендованную сингенную модель аденокарциномы III степени протоков поджелудочной железы для проведения доклинических исследований [171]. Подкожная имплантация Pan02 мышам линии C57BL/6 приводит к успешному образованию опухолей, среднее время удвоения которых составляет 4-5 дней, а мыши находятся в исследовании в течение ~30 дней после имплантации без потери веса. Кинетика роста позволяет использовать более чем трехнедельное терапевтическое окно для оценки противоопухолевого действия исследуемых препаратов [171].

Самки мышей линии C57BL/6-SPF, возраст 6-7 недель были приобретены в питомнике (SPF-виварий, ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ). Работа с животными проводилась строго согласно Протоколу №210223 от 21.02.2023 г, одобренному этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Мыши содержались в клетках со сплошным дном по 4-5 особей в условиях, согласно особенностям их жизнедеятельности (наличие материала для строительства гнезда и мест для укрытия, доступ к воде и еде, проведение хендлинга и т.д.). Животные адаптировались к новым условиям содержания в течение недели до эксперимента.

Начальное количество мышей в экспериментальных группах было по 10 особей, однако в последующем количество особей сократилось до 8. Отбор мышей проводили по критериям включения: попадание в терапевтическое окно (формирование опухоли до 10 дней), размер опухоли 5-7 мм, масса мышей 18-21 г, отсутствие признаков болезни, боли, дистресса.

2.8.1 Иммунизация мышей C57BL/6 штаммом 17D вируса желтой лихорадки

Иммунизацию мышей проводили однократно подкожно в основание хвоста с использованием игл размером 29G (SFM Hospital Products GmbH, Германия). Осветленный супернатант ВЖЛ (штамм 17D), полученный на клеточной линии Vero, вводили с титром вируса 10^6 БОЕ / 100 мкл на мышь. Для оценки эффективности иммунизации через 14 суток производили взятие сывороток крови у мышей и проводили реакцию нейтрализации.

2.8.2 Забор крови у мышей C57BL/6

Забор крови производили прижизненно трижды из лицевой вены для оценки гематологических показателей и наличия нейтрализующих антител: за три дня до иммунизации, через 14 дней после иммунизации (за 4 дня перед имплантацией клеток Pan02) и через 3 дня после введения клеток Pan02. Интервалы в 3-4 дня между манипуляциями были выдержаны для восстановления мышей. Последний забор крови производили перед эвтаназией животных также из лицевой вены. Во время процедуры мыши находились под действием анестезии, которая включала изначальное использование 4% изофлуорана с последующим снижением до 2,5%. Подача Изофлурана осуществлялась с помощью системы анестезии лабораторных грызунов R540 (RWD LifeScience, Китай). Взятие крови для оценки гематологических показателей осуществляли в пробирку содержащую ЭДТА. Взятие сывороток крови для реакции нейтрализации производили в пробирки типа Эппендорф.

2.8.3 Формирование сингенной модели Pan02 в мышах C57BL/6

Клетки аденокарциномы протоков поджелудочной железы мыши Pan02 с использованием игл, размером 29G, имплантировали подкожно $5,2 \times 10^5$ клеток в 100 мкл PBS в правое бедро мышей, массой 18-21 г. Мониторинг состояния животных проводили ежедневно. Набор массы тела контролировали дважды в

неделю. Объем опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля в двух- или трёхкратной повторности. Объём опухоли рассчитывали по следующей формуле (3):

$$V = \frac{a \cdot b^2}{2}, \quad (3)$$

где

a — большее из двух измерений;

b — меньшее из двух измерений.

Терапию начинали проводить по достижении опухоли размера 5-7 мм (100 мм³), который является оптимальным для внутриопухолевого введения препарата.

2.8.4 Виротерапия опухолей Pan02 штаммом 17D вируса желтой лихорадки

После формирования опухолей Pan02 мышам внутриопухолево, используя иглу 27 или 29G, вводили осветленный штамм 17D ВЖЛ с титром 10⁶ БОЕ/100 мкл, полученный на клеточной линии Vero. Группам без виротерапии (контроль) интратуморально вводили 100 мкл культуральной жидкости со средой DMEM, полученной от растущих клеток Vero. В группе животных с трехкратной виротерапией ВЖЛ внутриопухолевые инъекции в дозе 10⁶ БОЕ/100 мкл проводили трижды каждые 7 дней. Мониторинг состояния животных проводили ежедневно. Набор массы контролировали дважды в неделю. Объем опухоли измеряли два раза в неделю и рассчитывали, используя формулу 3.

При достижении гуманной конечной точки, определяемой как опухоль более 10 мм в двух измерениях или значительное ухудшение состояния здоровья животного, потенциально вызывающее сильные страдания (атрофия конечностей, отказ от еды или критическая потеря веса), мышей подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. Перед эвтаназией мышам подавали анестезию с помощью системы анестезии для лабораторных грызунов R540 (RWD LifeScience) с использованием 4% изофлуорана с последующим снижением до 2,5%. Далее проводили вскрытие, осматривали органы на наличие метастазов и собирали

образцы опухоли и региональных лимфоузлов. Опухоли вместе с близлежащими лимфатическими узлами иссекали и фиксировали в 10% формальдегиде в PBS для гистологического исследования или в чистом PBS для ПЦР-исследований.

Анализ эффективности терапии оценивали по кинетике роста опухоли, общему состоянию здоровья мыши (включающего переносимость инъекции, клинический анализ крови, изменения массы, оценки поведенческого состояния животного) и времени дожития.

2.9 Исследование крови мышей с опухолями Pan02

2.9.1 Анализ гематологических показателей

Анализ проводили сразу после взятия крови с использованием гематологического анализатора URIT-3020 (URITMedicalElectronicCo, КНР). Показатели крови мышей контролировали в четырех точках: 0 — интактные мыши (начало эксперимента); 1 — 14-й день после иммунизации; 2 — после имплантации клеток Pan02, до виротерапии ВЖЛ; 3 — гуманная конечная точка (окончание эксперимента). В ходе эксперимента контролировали такие показатели, как лейкоциты, лимфоциты, гранулоциты, моноциты, эритроциты, тромбоциты и гемоглобин. Полученные данные были проанализированы в сравнении со стандартами центра разведения Charles River [172].

2.9.2 Реакция нейтрализации

Для анализа титров нейтрализующих антител к ВЖЛ у мышей использовали метод бляшкообразования. Сыворотку крови мышей, иммунизированных ВЖЛ, собирали на 14-й день после иммунизации и в конце эксперимента. Сыворотку изначально разводили в 10 раз, затем проводили три или четыре трехкратных разведения и смешивали их с ВЖЛ в дозе $3 \cdot 10^3$ БОЕ/мл в соотношении 1:1 с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C. В качестве контроля вируса использовали штамм 17D ВЖЛ в дозе $1,5 \cdot 10^3$ БОЕ/мл, в качестве контроля клеток - бессывороточную среду 199. Полученными смесями инфицировали монослой

клеток Vero в 12-луночных планшетах по 100 мкл/лунка с инкубацией в течение 1 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C, периодически омывая монослой клеток. Затем добавляли 1 мл покрытия, состоящего из 1,25% метилцеллюлозы, среды 199 с солями Эрла и Хэнкса в соотношении 2:1, 0,1% гентамицина и 2% FBS. Через семь дней после инфицирования среду удаляли, клетки дважды промывали PBS, фиксировали 95% этанолом в течение 1 часа и окрашивали 0,1% кристаллическим фиолетовым. После подсчитывали количество бляшек для каждого разведения для расчета титра нейтрализующих антител. Расчет производили в логарифмических единицах по следующей формуле:

$$\text{Lg (nAB)} = \text{lg (A)} + (f * \text{lg}(d)), \quad (4)$$

где A — разведение, при котором количество бляшек составляет менее 50% по сравнению с контролем;

f — логарифмическая разность (коэффициент интерполяции), рассчитываемая следующим образом: $f = (50\% - M1) / (M2 - M1)$, (5)

где M1 — количество бляшек менее 50% по сравнению с контролем;

M2 — количество бляшек более 50% по сравнению с контролем;

d — коэффициент разбавления.

2.10 Статистический анализ

Для анализа данных использовали программное обеспечение Prism 8 (GraphPad Prism Software, США). Для анализа статистических различий между двумя группами использовался двусторонний t - критерий Стьюдента. Для анализа статистических различий между тремя или более группами использовали дисперсионный анализ ANOVA. Перед проведением анализа с использованием t - критерия Стьюдента или ANOVA все выборки проверяли на нормальность распределения. В случае выборок с ненормальным распределением применяли критерий Краскела-Уоллиса. Статистическую значимость кривых выживаемости Каплана-Майера определяли с помощью логрангового критерия (критерия Манталя-Кокса). Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) и $p < 0,001$ (***).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Оценка онколитического действия исследуемых флавивирусов *in vitro*

Поскольку онколитическая активность флавивирусов, в частности, вируса клещевого энцефалита (штамм Софьин) и вируса желтой лихорадки (штамм 17D), практически не изучена, изначально мы провели скрининг их противоопухолевой активности на панели перевиваемых клеточных культур опухолей мозга, поджелудочной железы, молочной железы, легких и толстой кишки [173]. Онколитическое действие исследуемых флавивирусов оценивали в сравнении с вирусом везикулярного стоматита (штамм Индиана) и полиовирусом 1 типа (штамм Сэбина), противоопухолевые свойства которых хорошо охарактеризованы [75; 148]. Среди методов оценки были применены метод МТТ-теста, оценка по цитопатогенному действию, а также по изменению количества вирусной РНК в культуральной жидкости зараженных клеточных линий с помощью ПЦР в режиме реального времени. Процедура проведения МТТ-теста была одинакова для всех клеточных линий: для определения минимального титра вируса, необходимого для достижения эффективного ЦПД, клеточные культуры инкубировали с вирусами с MOI в интервале от 1 до 0,0001. Жизнеспособность клеток оценивали через 3 суток для ВВС и полиовируса и через 5 суток для ВЖЛ и ВКЭ [173]. Статистическую оценку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, при этом в случаях выборок с ненормальным распределением применялся критерий Краскела-Уоллиса. Для оценки цитопатического действия и изменения количества вирусной РНК использовали культуры того же пассажа, что и для проведения МТТ-теста. ЦПД оценивали ежедневно в сравнении с незараженными клетками той же культуры по степени разрушения монослоя [10; 173; 174].

3.1.1 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели опухолей мозга

3.1.1.1 Клеточные линии глиомы

Чувствительность к вирусам определяли на опухолевых клеточных линиях глиобластомы человека GL6, LN-229, T98G и глиомы мыши GL-261. Изначально мы провели оценку онколитических эффектов вирусов, использовавшихся в качестве сравнения - штамма Индиана ВВС и штамма Сэбина полиовируса 1 типа, онколитическое действие на глиобластомах которых хорошо известно [175; 176]. ВВС при $MOI = 0,01$ проявлял наибольшую онколитическую активность на клеточной линии LN-229 - клетки полностью погибали, в то время как показатели выживаемости клеточных линий T98G, GL-261 и GL6 составили $22 \pm 5\%$, $10 \pm 3\%$ и $48 \pm 9\%$ соответственно (Рисунок 5А). Дальнейшее увеличение MOI привело к снижению онколитической активности, что, вероятно, было связано с тенденцией данного вируса к образованию большого количества неинфекционных вирусных частиц, препятствующих эффективному заражению клеток [177]. Полиовирус 1 типа, как и ожидалось, также эффективно лизировал глиобластомы человека GL6 и T98G при $MOI = 0,1$, а выживаемость клеточной линии LN-229 отмечалась на уровне $10 \pm 10\%$ при $MOI = 1$. Поскольку для проникновения полиовируса требуется рецептор PVR, который есть у человека, но отсутствует в мышинных клеточных линиях, глиома мыши GL-261 оставалась устойчивой к действию вируса (Рисунок 5Б). К сожалению, полученные профили чувствительности клеток к исследуемым флавивирусам (Рисунок 5В, Г) показали, что ВЖЛ и ВКЭ не проявляют цитотоксического действия в отношении глиобластомы человека. Выживаемость инфицированных клеток оставалась на том же уровне, что и контрольных образцов. Однако, выживаемость глиомы мыши GL-261 в результате воздействия ВЖЛ при $MOI = 0,1$ снижалась до $60 \pm 5\%$ (Рисунок 5В).

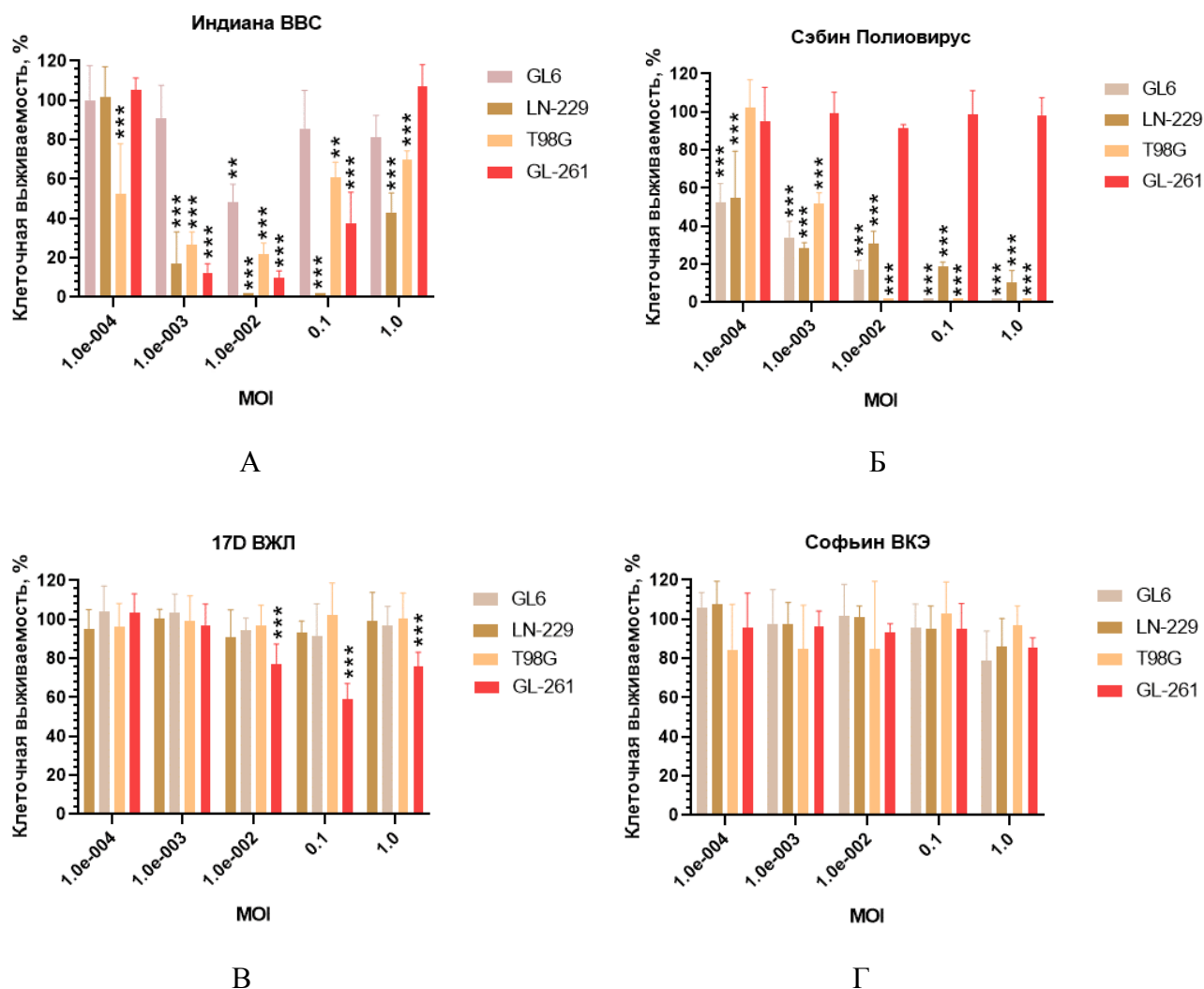


Рисунок 5 - Чувствительность клеточных линий глиобластом человека GL6, LN-229, T98G и глиомы мыши GL-261 к (А) ВВС (штамм Индиана), (Б) Полиовирусу 1 типа (штамм Сэбина), (В) ВЖЛ (штамм 17D) и (Г) ВКЭ (штамм Софьин) по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценка действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

Исследуемые культуры глиобластомы человека того же пассажа вели в культуральных флаконах объемом 25 см² с последующим заражением штаммом 17D ВЖЛ и штаммом Софьин ВКЭ с целью оценки ЦПД и отбора проб культуральной среды для исследования методом ПЦР в режиме реального времени. Для ВЖЛ результаты МТТ-теста коррелировали с результатами оценки по ЦПД. При MOI = 1 (10⁶ ГЭ/мл) мы наблюдали отсутствие ЦПД в отношении клеточных линий глиобластомы человека LN-229 и T98G, и лишь в отношении клеточной

линии GL6 наблюдалось небольшое разрушение монослоя, оцениваемое в 1 крест на 3 сутки эксперимента, однако увеличение ЦПД к пятым суткам не наблюдалось. Для исключения ошибки нами был проведен аналогичный эксперимент, где эффекты от воздействия ВЖЛ на клеточные линии оценивали до 10 суток. Полученные данные совпадали: для клеточных линий LN-229 и T98G наблюдали отсутствие ЦПД, а для клеточной линии GL6 наблюдали небольшое разрушение монослоя, оцениваемое в 1 крест, на 3 сутки эксперимента без последующего увеличения ЦПД вплоть до 10-х суток. В обоих экспериментах проводили отбор проб культуральной жидкости для оценки количества РНК ВЖЛ методом ПЦР в режиме реального времени. По результатам ПЦР в первом эксперименте мы обнаружили, что изменения количества РНК ВЖЛ были в пределах порядка ($6 \cdot 10^5$ – $7 \cdot 10^6$ ГЭ/мл) относительно дозы заражения (10^6 ГЭ/мл) во всех исследуемых клеточных линиях (Рисунок 6А). Полученные данные не позволяли сделать вывод о наличии или отсутствии репродукции вируса, однако при проведении более длительного эксперимента было выявлено снижение количества РНК ВЖЛ в культуральной жидкости для исследуемых культур, значения к десятым суткам эксперимента варьировались в пределах $6 \cdot 10^4$ - 10^5 ГЭ/мл (Рисунок 6Б), что свидетельствовало об отсутствии вирусной репродукции. Следовательно, по итогам всех экспериментов можно сказать, что штамм 17D ВЖЛ не проявляет онколитическую активность в отношении изученных клеточных линий глиобластомы человека.

Также была проведена оценка онколитических эффектов аналогичными методами для глиомы мыши GL-261, где мы наблюдали отсутствие ЦПД вплоть до 10-х суток эксперимента. При этом количество РНК ВЖЛ к третьим суткам эксперимента было на порядок ниже ($7 \cdot 10^4$ ГЭ/мл) в сравнении с его дозой заражения ($9 \cdot 10^5$ ГЭ/мл), однако затем падения количества РНК не наблюдали даже после замены культуральной среды (пятые сутки эксперимента) вплоть до 10-х суток эксперимента ($6 \cdot 10^4$ ГЭ/мл) (Рисунок 6Б). Таким образом, незначительные противоопухолевые эффекты в отношении глиомы мыши GL-261 присутствуют, однако онколитическое действие ВЖЛ значительно уступает ВВС.

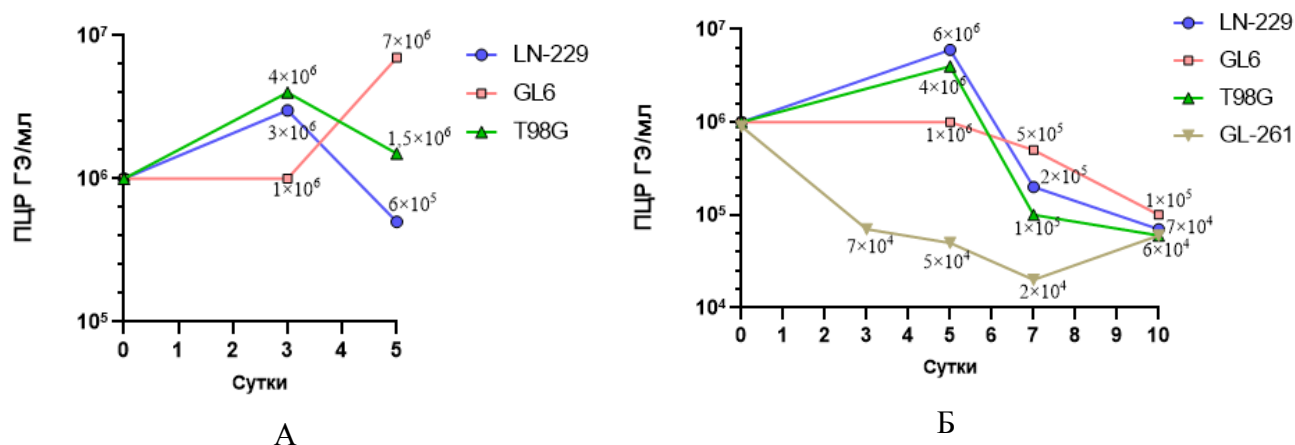


Рисунок 6 - Изменение количества РНК ВЖЛ в культуральной среде при инфицировании клеточных линий глиобластомы GL6, LN-229, T98G и глиомы GL-261 штаммом 17D ВЖЛ на 3, 5, 7 и 10-е сутки эксперимента. (А) В первом эксперименте количество РНК ВЖЛ контролировали до пятых суток. Клеточные линии имели тот же пассаж, что и при оценке онколитической активности методом МТТ-теста. (Б) Во втором эксперименте количество РНК ВЖЛ контролировали до десятых суток. Следует отметить, что на 3-и сутки для клеточной линии GL-6 и на 5-е сутки для клеточных линий LN-229, T98G и GL-261 производили замену культуральной среды

При проведении аналогичных экспериментов для штамма Софьин ВКЭ мы обнаружили, что при полном отсутствии цитопатического эффекта вирус, тем не менее, репродуцируется в клеточных линиях LN-229 и GL6. Такой вывод мы сделали исходя из результатов ПЦР-исследования культуральной жидкости, где в двух проведенных опытах наблюдали рост количества РНК ВКЭ (Рисунок 7). В культуральной жидкости клеточной линии LN-229 при дозе заражения равной 10^9 ГЭ/мл ($\text{MOI} = 1$), количество РНК ВКЭ достигло максимальной отметки к 5-м и 10-м суткам эксперимента и составило 1×10^{11} и 7×10^{10} ГЭ/мл соответственно. Для клеточной линии GL6 максимальное количество РНК ВКЭ равнялось 1×10^{11} ГЭ/мл для первого и 4×10^{10} ГЭ/мл для второго эксперимента (3-и сутки), после чего во втором эксперименте наблюдали снижение титра вируса. В культуральной жидкости клеточной линии T98G количество РНК ВКЭ фиксировалось на уровне дозы заражения - 2×10^9 ГЭ/мл в первом эксперименте (Рисунок 7А). Во втором эксперименте РНК ВКЭ определялась в культуральной жидкости вплоть до десятых суток, однако её количество было ниже ($1-4 \times 10^7$ ГЭ/мл) в сравнении с количеством на других клеточных линиях глиобластомы (Рисунок 7Б).

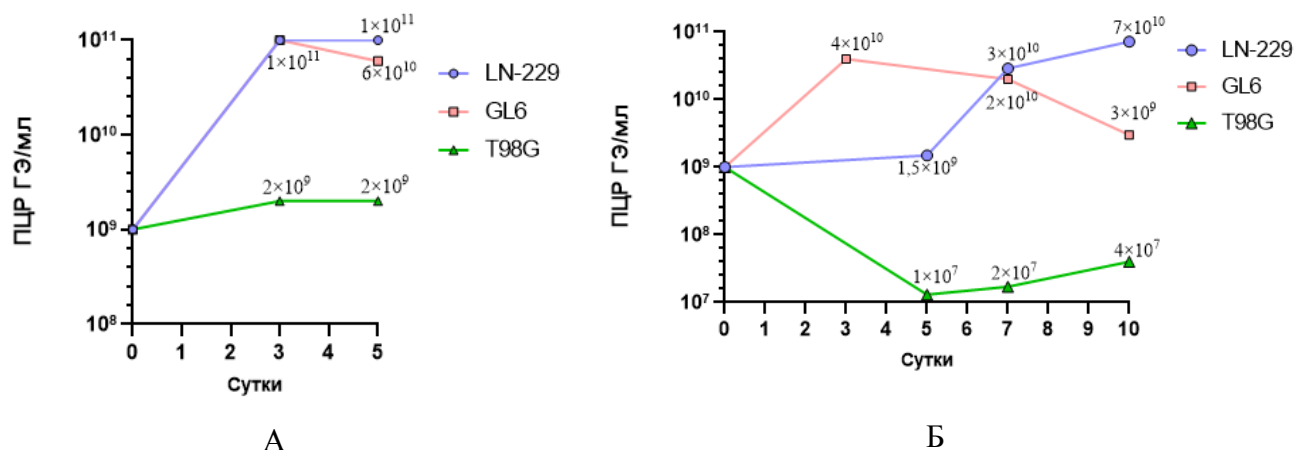


Рисунок 7 - Изменение количества вирусной РНК ВКЭ в культуральной среде при инфицировании клеточных линий глиобластомы GL6, LN-229, T98G штаммом Софьин ВКЭ на 3, 5, 7, 10-е сутки эксперимента. (А) В первом эксперименте количество РНК ВКЭ контролировали до пятых суток. Клеточные линии имели тот же пассаж, что и при оценке онколитической активности методом МТТ-теста. (Б) Во втором эксперименте количество РНК ВКЭ контролировали до десятых суток. Следует отметить, что на 3-и сутки для клеточной линии GL-6 и на 5-е сутки для линий LN-229 и T98G проводили замену культуральной среды

Таким образом, несмотря на природную нейротропность, ВКЭ (вакцинный штамм Софьин) не оказывает литического эффекта в отношении клеточных линий глиобластомы, при этом репродукция вируса в клетках сохраняется. Учитывая способность ВКЭ (штамм Софьин) вызывать энцефалит [178], его применение как противоопухолевого агента возможно только после предварительной иммунизации реципиентов инактивированной вакциной либо после генетической модификации штамма Софьин ВКЭ с целью улучшения его профиля безопасности. Учитывая отсутствие онколитического действия данного штамма, а также его нейровирулентность, его дальнейшее изучение в контексте онколитической терапии целесообразно продолжать только с точки зрения изучения механизмов резистентности глиобластомы к вирусному онколизу.

Результаты исследований, представленные в разделе 3.1.1.1, опубликованы в работе [173].

3.1.1.2 Клеточные линии нейробластомы

Была проведена оценка онколитической активности исследуемых вирусов (ВВС, ВЖЛ, ВКЭ, полиовирус) на клеточных линиях опухолей головного мозга -

нейробластомах, которые наиболее часто встречаются у детей до 5 лет [75; 179]. В работе использовали клеточные линии нейробластомы Kelly и SH-SY5Y. По результатам МТТ-теста все исследуемые вирусы оказывали лизирующее действие на культуры нейробластомы.

Наибольшую эффективность продемонстрировал ВВС: при $MOI = 0,001$ клеточная линия SH-SY5Y полностью погибала, а выживаемость клеточной линии Kelly составляла $6 \pm 2\%$ и не менялась с увеличением дозы вируса (Рисунок 8А). Наши результаты согласуются с ранее опубликованными исследованиями на обширной панели клеточных линий нейробластом, где также было отмечено высокоэффективное действие ВВС [180].

Полиовирус 1 типа полностью лизировал клетки Kelly при $MOI = 0,01-0,1$, в то время как выживаемость SH-SY5Y составила $24 \pm 3\%$ ($MOI = 0,1$), однако полного лизиса при этом не наблюдалось (Рисунок 8Б). Несмотря на отсутствие полной гибели SH-SY5Y, имеются данные свидетельствующие о регрессе опухолей *in vivo* в результате воздействия полиовируса. Однако у некоторых мышей в последующем опухоль рецидивировала [181].

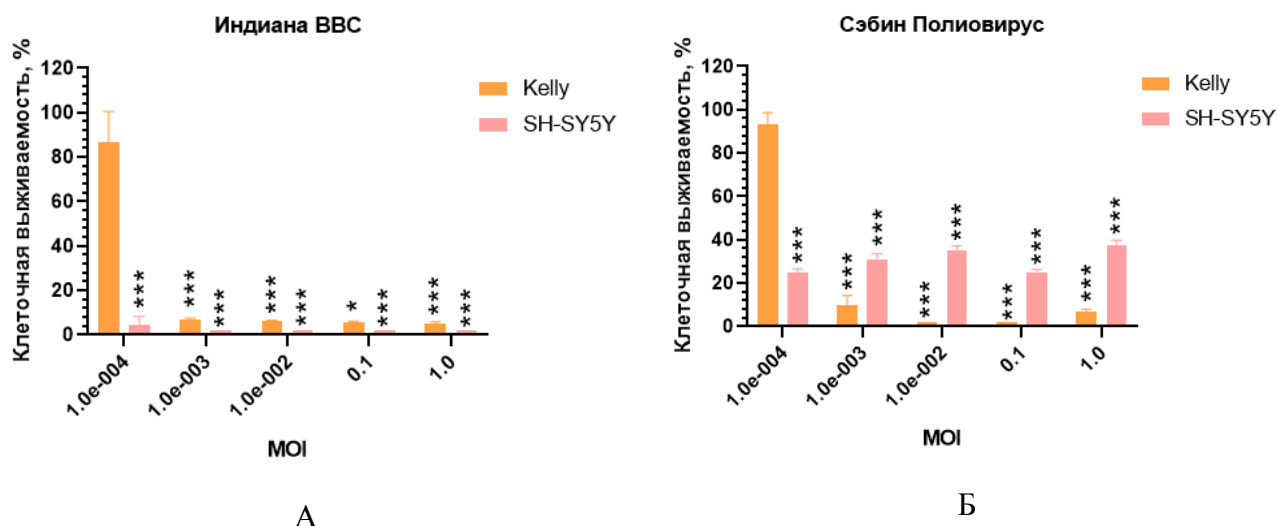


Рисунок 8 - Чувствительность клеточных линий нейробластом Kelly и SH-SY5Y к (А) ВВС (штамм Индиана) и (Б) полиовирусу 1 типа (штамм Сэбина) по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над

значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

ВЖЛ продемонстрировал онколитическую активность несколько уступающую ВВС. Для клеточной линии Kelly цитотоксический эффект ВЖЛ проявлялся при $MOI = 0,001$, а при максимальной инфекционной нагрузке - $MOI = 1$, средний показатель выживаемости составлял $41 \pm 9\%$ (Рисунок 9А). Для клеточной линии SH-SY5Y снижение выживаемости наблюдали уже при самой низкой множественности заражения ($MOI = 0,0001$), а полный лизис обнаруживали в 3-х из 6 лунок при $MOI = 0,1-1$, при этом в остальных лунках выживаемость не превышала 15% (Рисунок 9А).

Результаты эксперимента показали, что ВКЭ оказывает менее выраженное онколитическое действие в сравнении с ВВС, ВЖЛ и полиовирусом (Рисунок 9Б). Для клеточной линии Kelly слабый цитопатический эффект проявлялся при максимальной дозе заражения ($MOI = 1$), где среднее значение клеточной выживаемости составило $76 \pm 9\%$. Клеточная культура SH-SY5Y показала большую чувствительность к ВКЭ: онколитическое действие вируса отмечалось уже при $MOI = 0,001$, а при максимальной дозе заражения ($MOI = 1$) жизнеспособность клеток составила $30 \pm 6\%$.

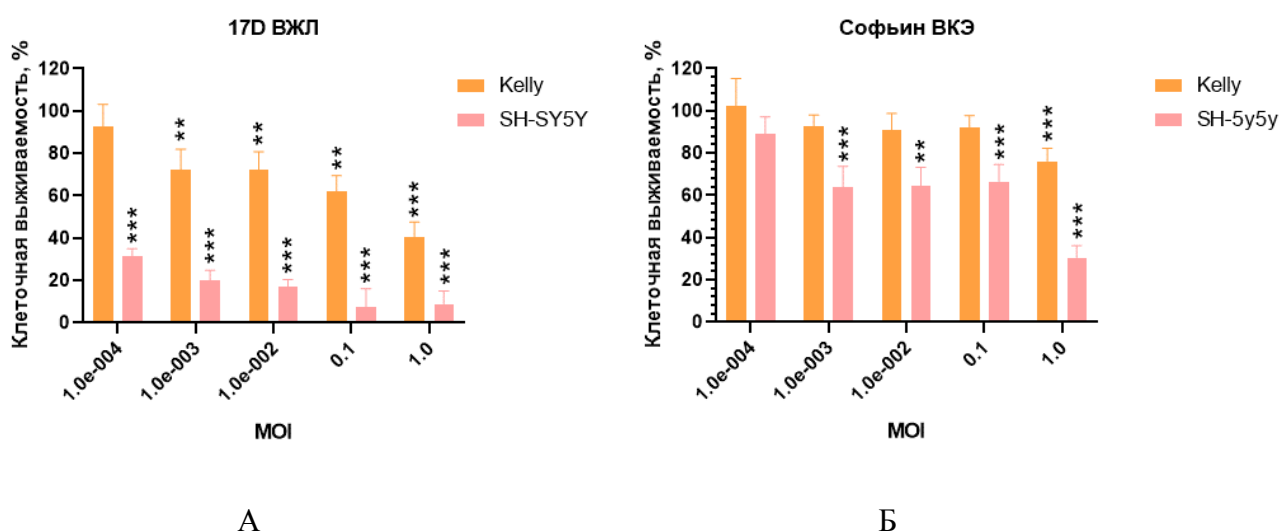


Рисунок 9 - Чувствительность клеточных линий нейробластом Kelly и SH-SY5Y к (А) ВЖЛ (штамм 17D) и (Б) ВКЭ (штамм Софьин) по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с

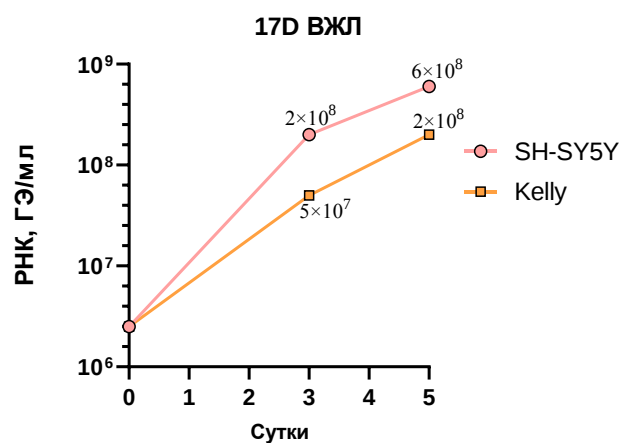
неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

Результаты ЦПД и ПЦР коррелировали с данными МТТ-теста. При инкубации клеточной линии SH-SY5Y со штаммом 17D ВЖЛ в дозе заражения $2,5 \cdot 10^6$ ГЭ/мл ($MOI = 1$) полную гибель клеток наблюдали к пятым суткам эксперимента (Рисунок 10А). При этом методом ПЦР в режиме реального времени было зафиксировано увеличение количества РНК ВЖЛ более чем на два порядка ($6 \cdot 10^8$ ГЭ/мл) по сравнению с исходной дозой заражения (Рисунок 10Б). Клеточная линия Kelly оказалась менее чувствительной к вирусу. К пятым суткам эксперимента в инфицированной культуре наблюдали разрушение монослоя, оцениваемое в 2 креста, а также увеличение количества РНК ВЖЛ до $2 \cdot 10^8$ ГЭ/мл (Рисунок 10).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о перспективности дальнейших исследований штамма 17D ВЖЛ на моделях *in vivo* в качестве потенциального онколитического агента для терапии нейробластом.

Вирус	17D ВЖЛ		
Клеточные линии	Сутки	3	5
SH-SY5Y	ЦПД	++	++++
Kelly		+	++

А



Б

Рисунок 10 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК ВЖЛ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании нейробластом SH-SY5Y и Kelly штаммом 17D ВЖЛ на 3-и и 5-е сутки эксперимента

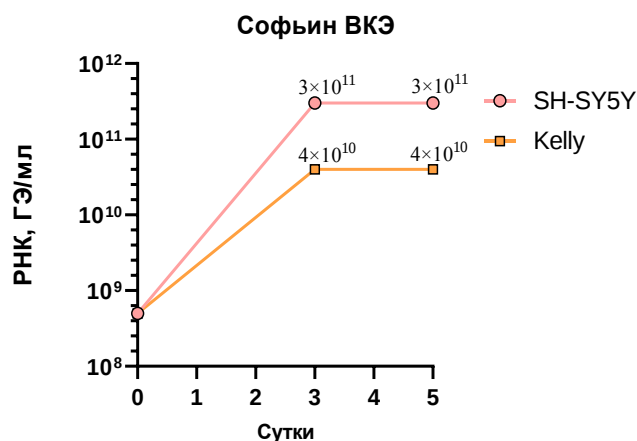
При исследовании ЦПД, вызываемого ВКЭ, было обнаружено, что его онколитическое действие не уступало таковому у ВЖЛ. При дозе заражения $5 \cdot 10^8$ ГЭ/мл ($MOI = 1$) мы наблюдали полную гибель клеточной линии нейробластомы

SH-SY5Y к пятым суткам эксперимента, в то время как в клеточной линии Kelly отмечалось ЦПД, оцениваемое в 2 креста (Рисунок 11А). По результатам ПЦР количество РНК ВКЭ к третьим суткам превысило исходную дозу практически на три порядка и достигло значения 3×10^{11} ГЭ/мл для культуры SH-SY5Y, а для культуры Kelly был обнаружен рост количества РНК ВКЭ практически на два порядка до значения 4×10^{10} ГЭ/мл. Примечательно, что к пятым суткам снижения количества РНК не наблюдали (Рисунок 11Б).

На основании проведённых экспериментов, в том числе МТТ-теста, можно сделать вывод, что ВКЭ (штамм Софьин) способен к активной репродукции в клеточных линиях нейробластомы, однако демонстрирует менее выраженное онколитическое действие по сравнению с другими исследуемыми вирусами.

Вirus	Софьин ВКЭ		
Клеточные линии	Сутки	3	5
SH-SY5Y	ЦПД	+++	++++
Kelly		+	++

А



Б

Рисунок 11 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК ВКЭ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании нейробластом SH-SY5Y и Kelly штаммом Софьин ВКЭ на 3-и и 5-е сутки эксперимента

3.1.1.3 Клеточные линии астроцитомы

В ходе исследования были использованы две перевиваемые культуры астроцитомы, полученные из послеоперационного материала от пациентов в рамках сотрудничества с ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Анамнез пациентов был следующим:

1. пациент мужского пола в возрасте 72 лет с диагнозом «Мультифокальная опухоль правой височной и лобной долей, класс опухоли II».

Последующее молекулярно-биологическое исследование в ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России позволило уточнить диагноз: глиобластома G4 с отсутствием мутаций в генах *Wt IDH1*, *IDH2* и *MGMT*, что указывало на высокую агрессивность и первичный характер опухоли.

2. пациент мужского пола в возрасте 60 лет с первичным диагнозом «Опухоль левой лобной доли, класс Ia». В последующем диагноз был уточнен: астроцитомы G4 с отсутствием мутаций в генах *IDH* и *MGMT*, что также свидетельствовало о высокой степени злокачественности опухоли.

Для получения первичных культур опухоль подвергали механическому измельчению с помощью одноразовой стерильной нейлоновой сетки с размером пор 40 микрон. Затем полученную суспензию промывали, гомогенизировали и культивировали в питательной среде DMEM-F12 с добавлением 2 mM L-глутамина, антибиотиков пенициллина (250 ME/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки, или в среде DMEM-F12 с аналогичными добавками и с добавлением 0,0025% EGF, 1% G5, 2% нейромакс. Таким образом, нами были получены две клеточные культуры: глиобластома от первого пациента (Рисунок 12А) и астроцитомы от второго пациента (Рисунок 12Б).

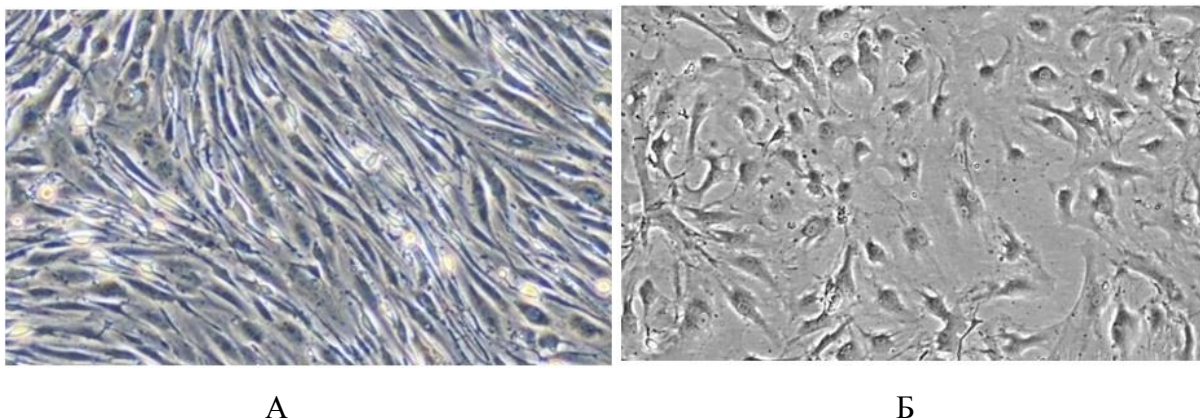


Рисунок 12 - Полученные перививаемые культуры (А) глиобластомы и (Б) астроцитомы. На фотографии представлены культуры 6-го и 5-го пассажа соответственно. Световая микроскопия при 100-кратном увеличении

Полученные культуры были изучены на чувствительность к ВВС, полиовирусу, ВЖЛ и ВКЭ с помощью МТТ-теста (Рисунок 13). ВЖЛ на культуре опухолевых клеток не проявлял онколитической активности в отношении

глиобластомы, что соответствовало полученным нами и описанным выше (раздел 3.1.1.1.) результатам исследований на других клеточных линиях глиобластомы человека. ВКЭ продемонстрировал слабый цитопатический эффект на культуре опухолевых клеток, который не превышал 20% гибели клеток даже при использовании максимальной дозы заражения ($MOI = 1$). Полиовирус 1 типа показал более выраженную онколитическую активность в отношении клеточной линии глиобластомы - клеточная выживаемость составила $27 \pm 9\%$ при $MOI = 1$, однако полной гибели клеток не наблюдалось. ВВС проявлял разную онколитическую активность в зависимости от пассажа культуры глиобластомы: не оказывал эффекта на 3 пассаж, однако далее, при исследовании его действия на 5-й и 11-й пассажи, мы наблюдали полную клеточную гибель (Рисунок 13А).

В отличие от глиобластомы, астроцитомы в разной степени проявляла чувствительность ко всем исследуемым вирусам, однако при этом ни один вирус не лизировал клетки полностью. Наибольшая клеточная гибель наблюдалась при действии на клетки полиовируса 1 типа: клеточная выживаемость фиксировалась на уровне $11 \pm 3\%$ при $MOI = 1$. Затем по онколитическому эффекту следовали ВЖЛ ($MOI = 1$) и ВВС ($MOI = 0,001$), при действии которых минимальная выживаемость составила $36 \pm 10\%$ и $43 \pm 4\%$, соответственно. Наименьший литический эффект продемонстрировал ВКЭ, при воздействии которого выживаемость клеточной линии астроцитомы достигала $69 \pm 15\%$ ($MOI = 1$) (Рисунок 13Б).

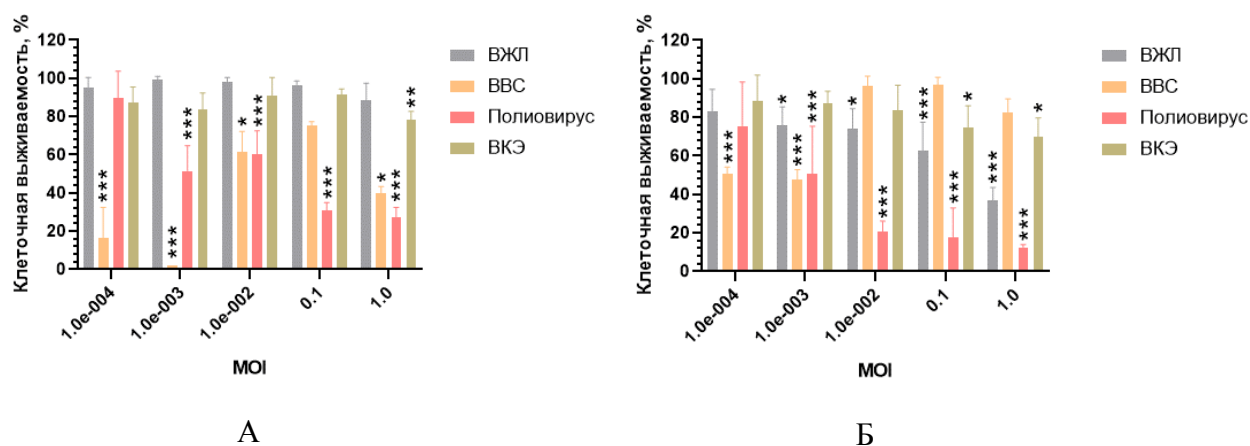


Рисунок 13 - Чувствительность клеточных линий (А) глиобластомы и (Б) астроцитомы к ВВС (штамм Индиана), полиовирусу 1 типа (штамм Сэбина), ВЖЛ (штамм 17D) и ВКЭ (штамм

Софьин) по результатам МТТ-теста. Клеточную выживаемость оценивали на пятые сутки. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую МОИ приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

Таким образом, результаты исследований клеточной линии глиобластомы на чувствительность к вышеперечисленным вирусам в целом согласуются с данными, полученными нами ранее на других клеточных линиях глиобластомы (раздел 3.1.1.1.). Однако следует отметить, что ВВС (штамм Индиана) не оказывал литического действия на опухолевые клетки глиобластомы раннего пассажа, что, вероятно, может указывать на возможное изменение экспрессии генов интерферона в процессе культивирования клеточной линии или на естественный отбор клеток с нарушенными интерфероновыми путями. В пользу последнего говорит тот факт, что изначально мы наблюдали высокую клеточную гетерогенность (до 4-5-го пассажа), однако затем сформировалась фенотипически однородная популяция (Рисунок 12А).

Клеточная линия астроцитомы оказалась чувствительной ко всем исследуемым вирусам по сравнению с клеточной линией глиобластомы. Наиболее эффективным в отношении культуры астроцитомы оказался полиовирус, демонстрирующий максимальную литическую активность, однако даже он не вызывал полной гибели опухолевых клеток. Примечательно, что клеточная линия астроцитомы проявляла чувствительность к ВЖЛ, который не проявляет онколитическую активность в отношении глиобластомы. Возможно, именно глиобластомы обладают врожденной устойчивостью к действию ВЖЛ, в то время как другие типы опухолевых клеток мозга сохраняют к нему чувствительность. Стоит, однако, отметить, что чувствительность к изученным вирусам была определена лишь по результатам одного эксперимента, что было связано с крайне медленным ростом культуры астроцитомы. Дальнейшие исследования позволят получить более полную картину действия исследуемых вирусов на полученные клеточные линии глиобластомы и астроцитомы.

3.1.2 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели аденокарциномы молочной железы

В эксперименте оценивали цитотоксическое действие флавивирусов на аденокарциному молочной железы в сравнении с ВВС и полиовирусом 1 типа. Чувствительность к вирусам определяли на опухолевых клеточных линиях MCF7 и MDA-MB-231. Согласно результатам МТТ-теста, клеточная линия MCF7 не подвергалась полной гибели при действии на нее ВВС. При этом наименьший показатель клеточной выживаемости составил $35 \pm 5\%$ (MOI = 0,1; 0,001; 0,0001), а в некоторых случаях достигал 50% (MOI = 0,01) (Рисунок 14А). Клеточная линия MDA-MB-231 оказалась более чувствительной к ВВС и полностью погибала при MOI = 0,01 (Рисунок 14А).

Полиовирус продемонстрировал высокую литическую активность в отношении обеих клеточных линий. Для MCF7 при MOI = 0,0001 наблюдалась полная клеточная гибель, тогда как полная гибель MDA-MB-231 наступала при более высокой дозе заражения - MOI = 0,1 (Рисунок 14Б). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей [182; 183].

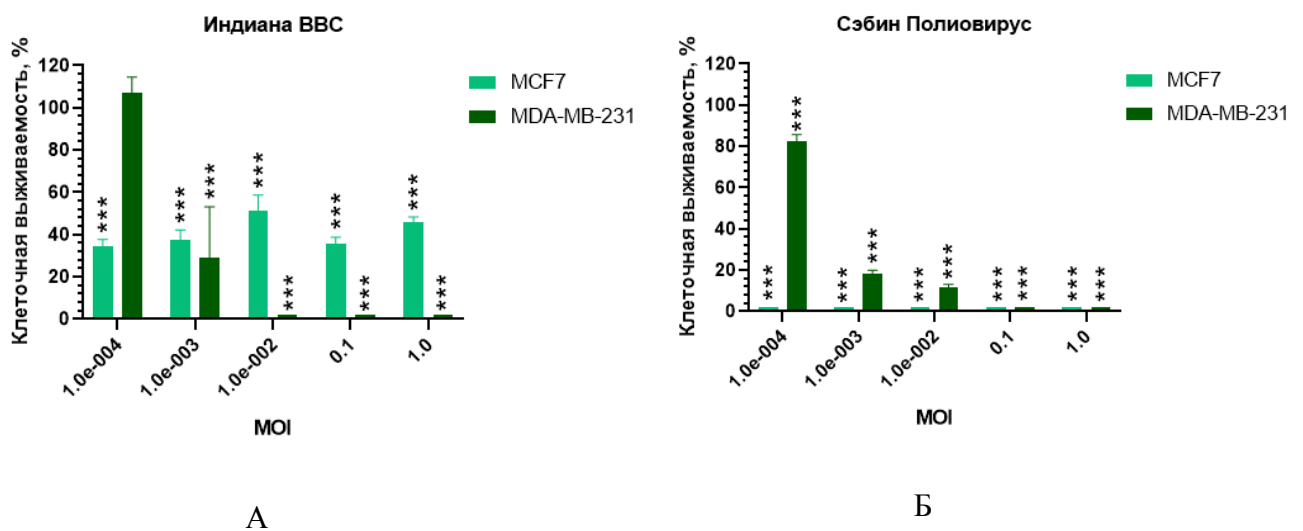


Рисунок 14 - Чувствительность клеточных линий аденокарциномы молочной железы MCF7 и MDA-MB-231 к (А) ВВС (штамм Индиана) и (Б) полиовирусу 1 типа (штамм Сэбина) по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не

представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

Литическое действие ВЖЛ на клеточную линию MCF7 оказалось сопоставимым с действием ВВС по результатам МТТ-теста. Эффект прослеживался уже при $MOI = 0,001$ и усиливался по мере увеличения инфекционной дозы (Рисунок 15А), при этом минимальная выживаемость MCF7 составляла $50 \pm 5\%$ при максимальной дозе заражения ($MOI = 1$). При оценке литического действия ВЖЛ на клеточную линию MDA-MB-231 было обнаружено, что клетки аденокарциномы не погибали полностью, как при действии ВВС и полиовируса, но проявляли определенную чувствительность. Минимальная выживаемость наблюдалась при максимальной инфекционной дозе ($MOI = 1$) и составляла $30 \pm 15\%$ (Рисунок 15А).

При исследовании онколитического действия ВКЭ мы обнаружили, что клеточная линия MDA-MB-231, высокочувствительная к другим исследуемым вирусам, оказалась абсолютно резистентной к действию ВКЭ (Рисунок 15Б). При этом на аденокарциному молочной железы MCF7 ВКЭ оказывал цитопатическое действие, сопоставимое с действием ВЖЛ и ВВС: клеточная выживаемость при $MOI = 1$ составляла $55 \pm 5\%$ (Рисунок 15Б).

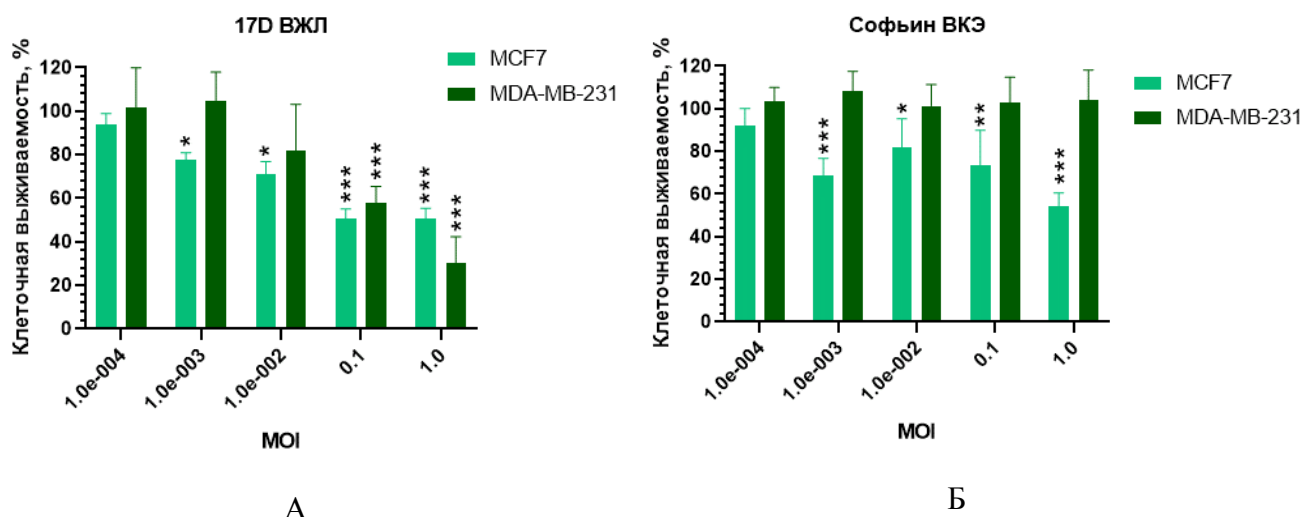


Рисунок 15 - Чувствительность клеточных линий аденокарциномы молочной железы MCF7 и MDA-MB-231 к (А) ВЖЛ (штамм 17D) и (Б) (ВКЭ штамм Софьин) по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса

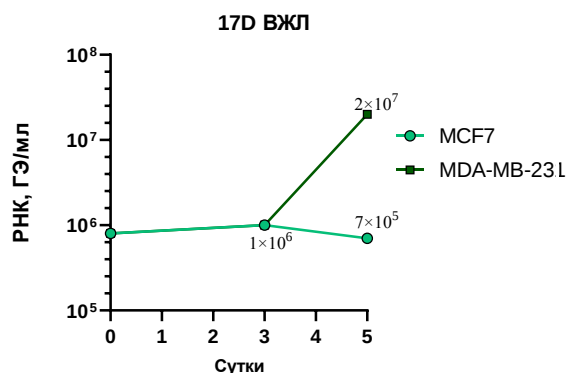
производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

По результатам оценки ЦПД на клеточной линии аденокарциномы MCF7 при дозе заражения штаммом 17D ВЖЛ, равной $8 \cdot 10^5$ ГЭ/мл ($MOI = 1$), к 5-м суткам эксперимента мы наблюдали небольшое разрушение монослоя, оцениваемое в 1 крест. Для аденокарциномы MDA-MB-231 разрушение монослоя было оценено нами в 2 креста (Рисунок 16А). Анализ культуральной жидкости MCF7 методом количественной ПЦР в режиме реального времени показал сохранение количества РНК ВЖЛ к 5-м суткам на уровне инфекционной дозы ($7 \cdot 10^5$ ГЭ/мл), в то время как в культуральной жидкости MDA-MB-231 было зафиксировано увеличение количества РНК ВЖЛ более чем на порядок ($2 \cdot 10^7$ ГЭ/мл) в сравнении с дозой заражения (Рисунок 16Б).

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о наличии онколитического эффекта штамма 17D ВЖЛ на исследуемых культурах, при этом клеточная линия MDA-MB-231 демонстрирует более высокую восприимчивость к ВЖЛ.

Вирус	17D ВЖЛ		
Клеточные линии	Сутки	3	5
MCF7	ЦПД	+	+
MDA-MB-231		+	++

А



Б

Рисунок 16 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК ВЖЛ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании опухолевых клеток молочной железы MCF7 и MDA-MB-231 штаммом 17D ВЖЛ на 3-и и 5-е сутки эксперимента

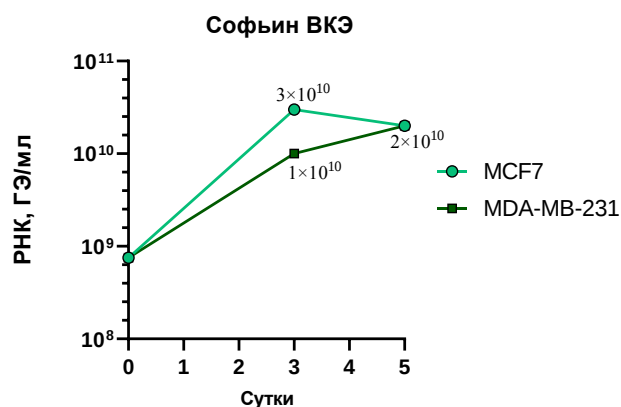
ВКЭ при дозе заражения $7,5 \cdot 10^8$ ГЭ/мл ($MOI = 1$) оказывал цитопатическое действие на исследуемые клеточные линии, которое к пятым суткам эксперимента

оценивалось лишь в 1 крест (Рисунок 17А). При этом количество РНК ВКЭ к 3-м суткам увеличивалось более чем на порядок (3×10^{10} ГЭ/мл для MCF7 и 1×10^{10} ГЭ/мл для MDA-MB-231) по сравнению с дозой заражения и не изменялось вплоть до пятых суток эксперимента (Рисунок 17Б).

Таким образом, мы обнаружили слабое онколитическое действие ВКЭ на аденокарциному молочной железы. Прослеживается интересная особенность штамма Софьин ВКЭ: при отсутствии или наличии слабого литического эффекта на клеточные линии различной этиологии мы наблюдаем активную репродукцию вируса, что подтверждается увеличением количества РНК ВКЭ более чем на порядок методом ПЦР в режиме реального времени в исследуемых культурах.

Вирус	Софьин ВКЭ		
Клеточные линии	Сутки	3	5
MCF7	ЦПД	+	+
MDA-MB-231		-	+

А



Б

Рисунок 17 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК ВКЭ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании опухолевых клеток молочной железы MCF7 и MDA-MB-231 штаммом Софьин ВКЭ на 3-и и 5-е сутки эксперимента

В заключении следует отметить, что на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы мы обнаружили корреляцию онколитического эффекта с интерфероновым статусом культуры. Клеточная линия MCF7, которая сохраняет интактными интерфероновые пути и в какой-то степени способна к индукции интерферона 1 типа в ответ на вирусную инфекцию [184], была менее чувствительна к действию ВВС и ВЖЛ по сравнению с MDA-MB-231, которая имеет нарушение передачи сигналов через путь JAK/STAT [185]. Полиовирус

полностью лизирует данные клеточные линии, что, вероятно, связано с его способностью снижать индукцию интерферона [186]. Интересно, что при действии ВКЭ по результатам МТТ-теста наблюдается снижение выживаемости только у клеточной линии MCF7, а в более чувствительной к вирусной инфекции культуре MDA-MB-231 обнаруживается лишь активная репликация вируса (что подтверждается результатами ПЦР-исследований), при этом клеточной гибели не происходит.

3.1.3 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели опухолей толстой кишки

Изначально нами была проведена оценка онколитического действия ВВС и полиовируса 1 типа методом МТТ-теста. В ранее опубликованной работе другими исследователями было показано, что клеточные линии опухолей толстой кишки SW-480, HT-29 чувствительны к действию ВВС [187]. В нашем исследовании для оценки чувствительности были использованы другие клеточные линии аденокарциномы, карциномы толстой кишки человека SW620, HCT-116 и карцинома толстой кишки мыши C-26. Известно, что клеточные линии HCT-116 и SW620 имеют функциональный JAK/STAT [188; 189], в случае культуры HCT-116 также известно, что ее уровни экспрессии интерферона 1 типа низкие [188], в то время как для культуры SW620 подобных исследований мы не нашли. Поскольку по результатам наших экспериментов обе клеточные линии были чувствительны к ВВС, можно сделать вывод о также низкой экспрессии интерферона 1 типа или низкой восприимчивости к эндогенному интерферону культуры SW620. Наибольший онколитический эффект ВВС проявлял на клеточной линии HCT-116: при действии вируса в $MOI = 0,01$ клеточная выживаемость варьировалась от 0 до 10% (Рисунок 18А). Для клеточной линии SW620 показатель выживаемости был немного выше и составлял $12 \pm 2\%$ при той же дозе заражения. Наибольшая клеточная выживаемость была отмечена на клеточной линии C26, где при $MOI = 0,1$ выживаемость составила $28 \pm 3\%$ (Рисунок 18А).

При действии штамма Сэбина полиовируса 1 типа на исследуемые клеточные линии мы не наблюдали полного лизиса клеточного монослоя, что совпадало с данными, полученными в другом исследовании [190]. При самой высокой MOI = 1 клеточная выживаемость для НСТ-116 составляла $18 \pm 3\%$, а для SW620 показатель выживаемости был выше и отмечался на уровне $31 \pm 3\%$ (Рисунок 18Б). Как и ожидалось, на мышинной клеточной линии в результате действия полиовируса онколитического эффекта не наблюдалось.

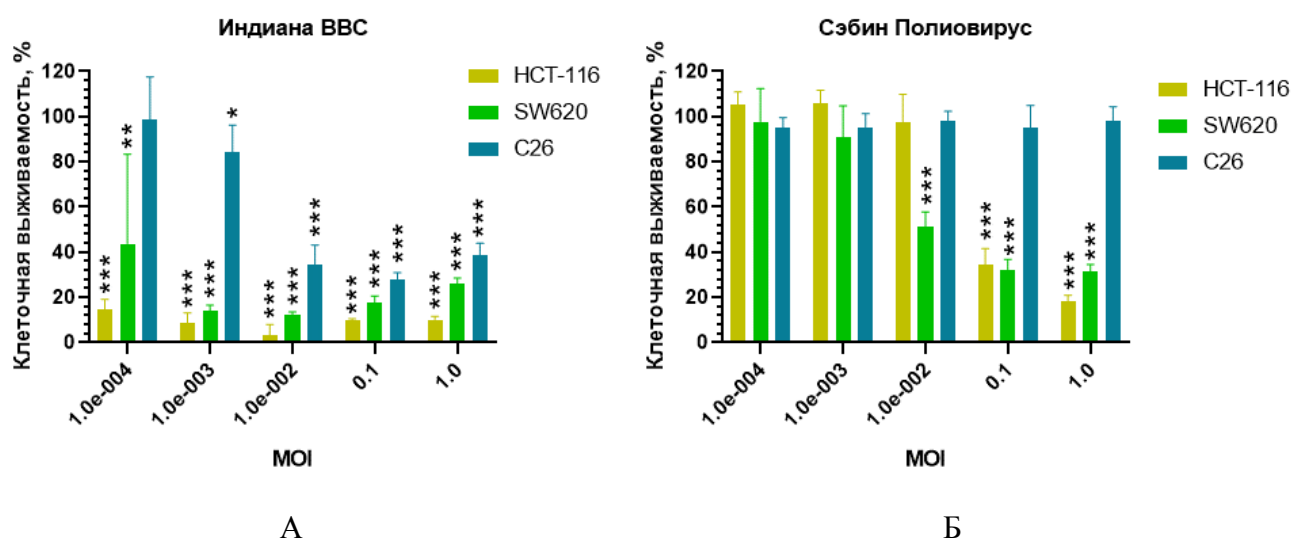


Рисунок 18 - Чувствительность клеточных линий опухолей толстой кишки НСТ-116, SW620 и C26 к (А) ВВС (штамм Индиана) и (Б) полиовируса 1 типа (штамм Сэбина) по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

На следующем этапе мы оценили онколитическую активность исследуемых флавивирусов (ВЖЛ, ВКЭ). По результатам МТТ-теста клеточные линии опухолей толстой кишки человека оказались в разной степени чувствительны к ВЖЛ, а клеточная линия карциномы толстой кишки мыши C26 оказалась устойчивой к действию вируса (Рисунок 19А). Онколитическое действие ВЖЛ на клеточную линию SW620 не уступало действию полиовируса, где при MOI = 1 клеточная выживаемость составила $28 \pm 4\%$. А в случае клеточной линии НСТ-116 ВЖЛ проявлял менее выраженное литическое действие по сравнению с ВВС и

полиовирусом: при максимальной дозе заражения ($MOI = 1$) выживаемость НСТ-116 составила $42 \pm 5\%$ (Рисунок 19А).

Исследуемые клеточные линии колоректальных опухолей человека показали схожую с ВЖЛ и полиовирусом чувствительность к ВКЭ: клеточная выживаемость при $MOI = 1$ для SW620 составила $38 \pm 5\%$, в то время как для НСТ-116 показатель выживаемости был немного ниже и составил $34 \pm 6\%$ (Рисунок 19Б). Как и для ВЖЛ карцинома толстой кишки мыши С26 оказалась нечувствительной к действию ВКЭ (Рисунок 19Б). Известно, что мышинный интерферон ограничивает репродукцию флавивирусов [191; 192], вероятно, отсутствие онколитического действия связано с этим фактом, хотя исследований о способности С26 продуцировать интерферон на высоком уровне мы не нашли, известно, что в клеточной линии функционален путь JAK/STAT [193].

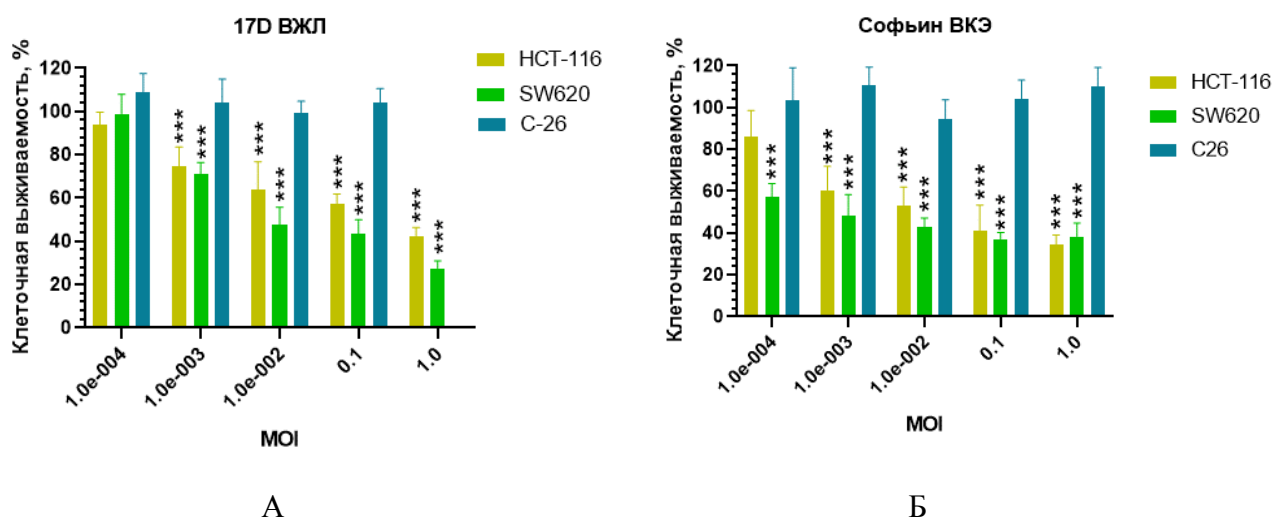


Рисунок 19 - Чувствительность клеточных линий опухолей толстой кишки НСТ-116, SW620 и С26 к (А) ВЖЛ (штамм 17D) и (Б) ВКЭ (штамм Софьин) по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

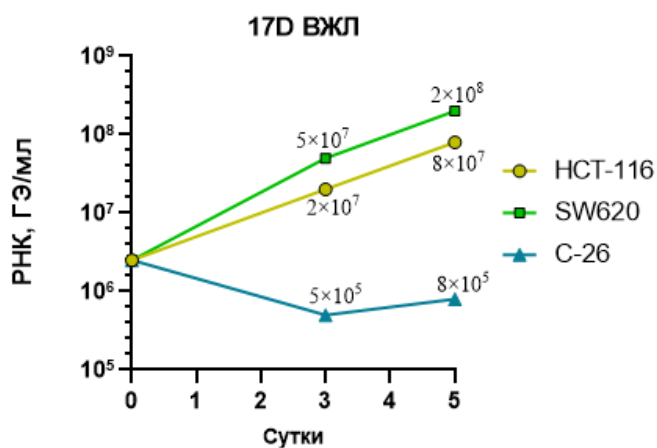
По результатам ЦПД при дозе заражения штаммом 17D ВЖЛ, равной $2,5 \cdot 10^6$ ГЭ/мл ($MOI = 1$), к 5-м суткам эксперимента для клеточной линии НСТ-116 наблюдалось разрушение монослоя, оцениваемое в 1 крест. В случае культуры SW620 степень разрушения монослоя была более значительной и составила 2

креста к пятым суткам (Рисунок 20А). Для мышинной клеточной линии С-26 не было зафиксировано какого-либо цитопатического действия. По результатам количественной ПЦР в режиме реального времени наблюдался рост количества РНК ВЖЛ более чем на порядок для клеточной линии НСТ-116 (8×10^7 ГЭ/мл) и практически на два порядка для SW620 (2×10^8 ГЭ/мл) к 5-м суткам эксперимента (Рисунок 20Б). В культуральной жидкости карциномы толстой кишки мыши С26 количество РНК ВЖЛ оставалось на уровне дозы заражения (8×10^5 ГЭ/мл) (Рисунок 20 Б). Полученные данные указывают на необходимость дополнительных исследований для оценки способности к репродукции ВЖЛ в клеточной линии С26.

На основе полученных данных можно сделать вывод о наличии онколитического действия ВЖЛ (штамм 17D) на клеточные линии колоректальных опухолей человека. При этом аденокарцинома SW620 оказалась более чувствительной к действию вируса по сравнению с НСТ-116. Однако, при планировании дальнейших исследований *in vivo* на сингенной модели возникает необходимость в подборе более чувствительной мышинной клеточной линии, поскольку С-26 продемонстрировала низкую восприимчивость к ВЖЛ.

Вirus	17D ВЖЛ		
Клеточные линии	Сутки	3	5
НСТ-116	ЦПД	-	+
SW620		+	++
С-26		-	-

А



Б

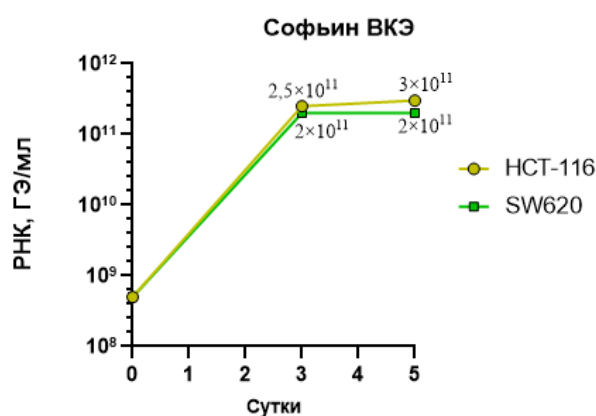
Рисунок 20 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК ВЖЛ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании опухолевых клеток толстой кишки НСТ-116, SW620 и С26 штаммом 17D ВЖЛ на 3-и и 5-е сутки эксперимента

ВКЭ оказывал цитопатическое действие на карциному и аденокарциному толстой кишки человека НСТ-116 и SW620. Степень ЦПД, оцениваемая в 2 креста, достигалась к пятым суткам эксперимента (Рисунок 21А). По результатам ПЦР было установлено, что количество РНК ВКЭ в обеих культурах имело схожие показатели. К пятым суткам эксперимента в культуре НСТ-116 количество составляло 3×10^{11} ГЭ/мл, а в культуре SW620 - 2×10^{11} ГЭ/мл, что значительно выше дозы заражения, которая составила 5×10^8 ГЭ/мл (Рисунок 21Б).

Таким образом, несмотря на схожее цитотоксическое действие с ВЖЛ и полиовирусом, ВКЭ (штамм Софьин) продемонстрировал значительно более высокую способность к репродукции в клетках опухолей толстой кишки человека.

Вirus	Софьин ВКЭ		
Клеточные линии	Сутки	3	5
НСТ-116	ЦПД	+	++
SW620		-	++

А



Б

Рисунок 21 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК ВКЭ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании человеческих опухолей толстой кишки НСТ-116 и SW620 штаммом Софьин ВКЭ на 3-и и 5-е сутки эксперимента

3.1.4 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели карциномы легкого

Чувствительность к вирусам исследовали на клеточной линии карциномы легких A549. Клеточная линия A549 неоднократно использовалась для изучения онколитического действия ВВС в качестве модели немелкоклеточного рака легких [84; 194; 195]. Результаты *in vitro* показывают различную чувствительность клеточной линии в зависимости от штамма вируса: от 0 до 70% выживаемости клеток. Интересно, что в исследовании наших коллег по результатам МТТ-теста

инфекция, вызванная штаммом Индиана ВВС в дозе $6 \cdot 10^7$ БОЕ/мл, снижала выживаемость клеток лишь на 30% [195], в то время как наши результаты указывают на снижение выживаемости до $72 \pm 7\%$ (Рисунок 22) при дозе заражения 10^4 БОЕ/мл ($3 \cdot 10^2$ БОЕ/лунка; MOI = 0,001). Вероятно, такая разница связана со способностью ВВС образовывать большое количество неинфекционных частиц, которые адсорбируются на поверхности клетки и мешают проникновению инфекционных вирионов [177]. Как упоминалось ранее, именно поэтому ВВС проявляет максимальную эффективность, как правило, не при самых высоких дозах заражения в исследованиях *in vitro*. В любом случае, различные штаммы ВВС продемонстрировали способность лизировать ксенотрансплантаты А549 на моделях *in vivo* [84; 194].

На данный момент нет описанных исследований онколитического действия полиовируса на карциному легкого, однако существуют предположения о перспективности такого подхода [196]. По результатам МТТ-теста было установлено, что штамм Сэбина полиовируса 1 типа демонстрирует высокую эффективность в лизисе клеточной линии А549 уже при MOI = 0,0001 (Рисунок 22).

По результатам наших исследований было установлено, что ВЖЛ хотя и уступал полиовирусу по литическому эффекту, но был эффективнее ВВС: 50%-ная выживаемость отмечалась при MOI = 0,1, а полная гибель клеток достигалась при MOI = 1. Наименее выраженным литическим действием среди всех исследуемых вирусов обладал ВКЭ. При воздействии на карциному легкого А549 максимальной дозы вируса (MOI = 1) клеточная выживаемость составила $36 \pm 12\%$ (Рисунок 22).

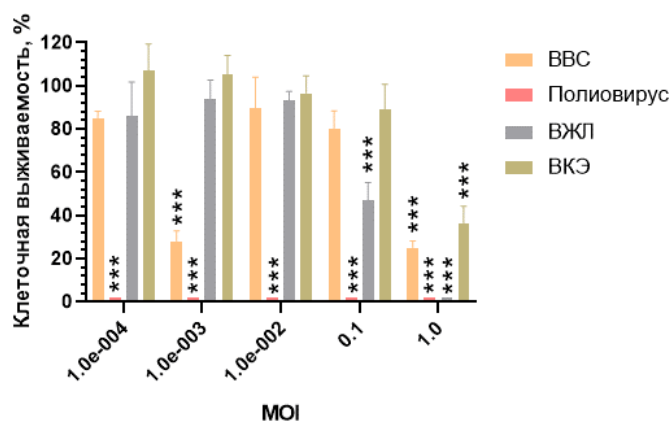


Рисунок 22 - Чувствительность карциномы легкого А549 к штаммам Индиана ВВС, Сэбина

полиовируса 1 типа, 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

При оценке ЦПД было выявлено полное разрушение монослоя, оцениваемое в 4 креста, уже на третьи сутки эксперимента как для ВЖЛ, так и для ВКЭ (Таблица 1). Однако, из-за стремительной гибели клеток к третьим суткам эксперимента мы столкнулись с определёнными ограничениями в исследовании. В частности, не удалось провести полностью оценку динамики изменения количества РНК. Тем не менее было установлено значительное увеличение количества РНК для обоих исследуемых вирусов - более чем на порядок по сравнению с исходной дозой заражения (Таблица 1).

Таблица 1 - Оценка цитопатического действия и изменения количества вирусной РНК ВЖЛ и ВКЭ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании клеточной линии карциномы легкого А549 штаммами 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на 3-и сутки эксперимента

Вирус	Опыт	Сутки	
		0	3
ВЖЛ (17D)	ЦПД	-	++++
	ПЦР, ГЭ/мл	10^6	$4 \cdot 10^7$
ВКЭ (Софьин)	ЦПД	-	++++
	ПЦР, ГЭ/мл	10^9	$3 \cdot 10^{10}$

Известно, что клеточная линия А549 способна в какой-то степени к индукции интерферона и имеет функциональный путь JAK/STAT [197; 198]. Именно поэтому высокочувствительный к интерферону ВВС не лизировал культуру полностью. Также низкой эффективностью по сравнению с другими исследуемыми вирусами

обладал ВКЭ. Высококчувствительной культура оказалась к действию полиовируса и ВЖЛ (выживаемость 0%), что связано со способностью полиовируса снижать продукцию интерферона [186], а в случае ВЖЛ показана его способность ингибировать путь JAK/STAT [199]. Однако для более полной оценки терапевтического потенциала этих вирусов в отношении карциномы легкого необходимы дальнейшие исследования. В первую очередь требуется расширить спектр исследуемых клеточных линий, чтобы определить специфичность и универсальность онколитического действия вирусов. Затем требуется проведение исследований *in vivo* для полноценной оценки вирусного онколиза.

3.1.5 Оценка онколитического действия флавивирусов на модели протоковой аденокарциномы поджелудочной железы

При оценке онколитического потенциала исследуемых вирусов на модели протоковой аденокарциномы поджелудочной железы были использованы клеточные линии человека PANC-1, MIAPaCa-2, Саран-2 и мыши Pan02. Известно, что различные штаммы ВВС демонстрируют высокую перспективность в качестве противоопухолевых агентов при лечении опухолей поджелудочной железы. Например, PANC-1 и MIAPaCa-2 являются высокопермиссивными для ВВС из-за дефектных интерфероновых путей, в то время как клеточная линия Саран-2 ограниченно поддерживает инфекцию, вызываемую ВВС, из-за ее интактной интерфероновой системы [200]. Полученные нами результаты согласуются с данными утверждениями. В результате действия штамма Индиана ВВС при MOI = 0,01 клеточная линия MIAPaCa-2 погибала полностью, в то время как выживаемость культуры PANC-1 составила $7 \pm 2\%$. При этом аденокарцинома поджелудочной железы Саран-2 была более устойчива к действию вируса: самая низкая выживаемость фиксировалась при MOI = 0,1 и составила $66 \pm 10\%$ (Рисунок 23А). Примечательно, что наши исследования показали полную гибель мышинной клеточной линии Pan02 при MOI = 0,01 (Рисунок 23А), что отличается от данных другого исследования, в котором инфекция, вызванная ВВС, приводила лишь к 50%-ной гибели мышинной клеточной линии [201]. Вероятно, расхождение в

результатах связано с использованием разных штаммов ВВС: Индиана в нашем исследовании и VSV-ΔM51-GFP в упомянутом.

Что касается штамма Сэбина полиовируса 1 типа, его онколитические свойства в отношении опухолей поджелудочной железы изучены недостаточно. Наши результаты показывают высокую чувствительность карциномы МIAPaCa-2 к полиовирусу (0% выживаемость при MOI = 1), удовлетворительную чувствительность карциномы PANC-1 ($28 \pm 4\%$ выживаемости при MOI = 1) и отсутствие чувствительности аденокарцином Capan-2 и Pan02 (Рисунок 23Б).

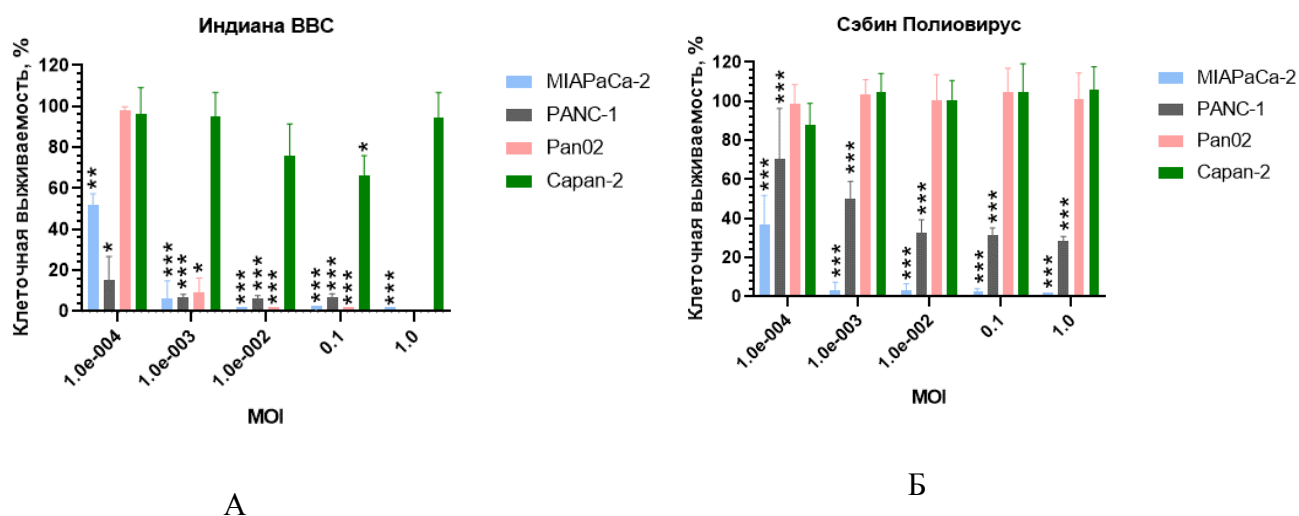


Рисунок 23 - Чувствительность клеточных линий протоковой аденокарциномы поджелудочной железы МIAPaCa-2, PANC-1, Capan-2, Pan02 к штаммам (А) Индиана ВВС и (Б) Сэбина полиовируса 1 типа по результатам МТТ-теста. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую MOI приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

При изучении онколитического действия исследуемых флавивирусов нами было обнаружено, что ВЖЛ оказывает схожий с полиовирусом цитопатический эффект. К пятым суткам эксперимента в результате воздействия ВЖЛ клеточная выживаемость МIAPaCa-2 фиксировалась на уровне 50% уже при MOI = 0,0001, а при титрах MOI = 0,1-1 практически равнялась 0% (Рисунок 24А). Для клеточной линии PANC-1 наблюдали менее выраженный, но всё же заметный онколитический эффект: 50%-ная выживаемость отмечалась при MOI = 0,01 и с увеличением титра

изменялась незначительно. Мы не обнаружили прямого литического эффекта на клеточные линии Саран-2 и Pan02 (Рисунок 24А).

ВКЭ обладал менее выраженным онколитическим действием. В отличие от других исследуемых вирусов, при воздействии ВКЭ полного клеточного лизиса в культуре МИАПаСа-2 не происходило, 50%-ная выживаемость отмечалась при минимальном $MOI = 0,001$ и с увеличением инфекционной дозы снижалась незначительно (до $48 \pm 10\%$) (Рисунок 24Б). В клеточной культуре PANC-1 наблюдалась интересная динамика. На 3-и сутки эксперимента мы зафиксировали значительное снижение выживаемости при $MOI = 0,001$ и 50%-ную выживаемость при самой высокой дозе заражения ($MOI = 1$) (Рисунок 24В). Однако к пятым суткам цитотоксический эффект значительно снижался и выживаемость клеточной линии PANC-1 составляла около $78 \pm 5\%$. Как и для ВЖЛ мы не обнаружили прямого литического эффекта на клеточные линии Саран-2 и Pan02 (Рисунок 24Б).

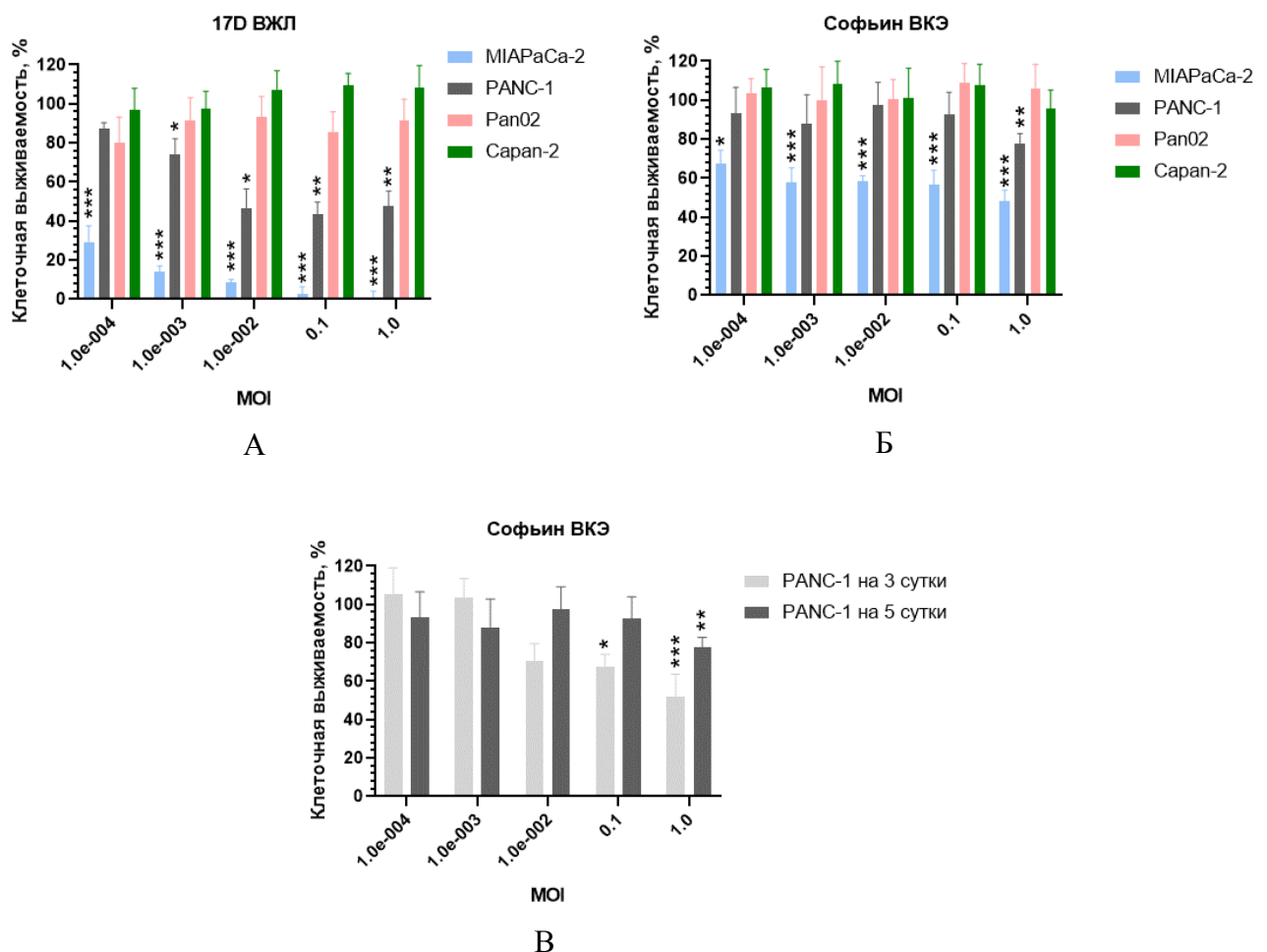


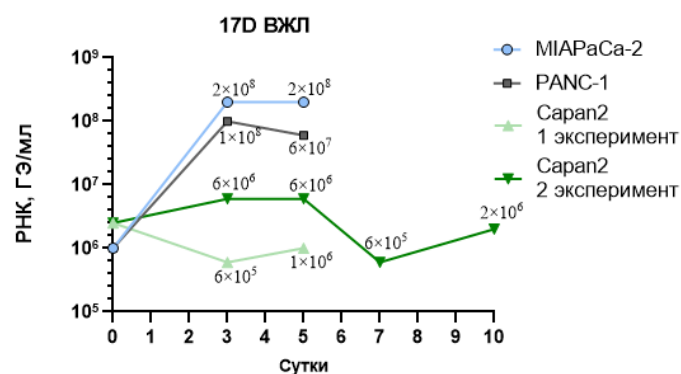
Рисунок 24 - Чувствительность клеточных линий протоковой аденокарциномы поджелудочной железы МИАПаСа-2, PANC-1, Саран-2, Pan02 к штаммам (А) 17D ВЖЛ и (Б) Софьин ВКЭ по результатам МТТ-теста (пятые сутки эксперимента). (В) Выживаемость клеточной линии PANC-

1 в результате действия штамма Софьин ВКЭ на третьи и пятые сутки эксперимента. Значения клеточной выживаемости представлены в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение. На каждую МОІ приходилось по 6 измерений. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия вируса производили в сравнении с неинфицированными клетками (на графиках не представлено). Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

Результаты оценки ЦПД для штамма 17D ВЖЛ соответствуют данным МТТ-теста: при дозе заражения 10^6 ГЭ/мл (МОІ = 1) к пятым суткам разрушение монослоя оценивали в 4 креста в отношении клеточной линии МІАРас-2, в 2 креста в отношении PANC-1 и отсутствие ЦПД в отношении Саран-2 (Рисунок 25А). По данным ПЦР в режиме реального времени количество вирусной РНК увеличилось на два порядка (до $2 \cdot 10^8$ ГЭ/мл) к пятым суткам в культуральной жидкости МІАРас-2, а в культуральной жидкости PANC-1 наблюдалось увеличение количества РНК более чем на порядок (до $6 \cdot 10^7$ ГЭ/мл) (Рисунок 25Б). Для клеточной линии Саран-2 изначально динамику изменения количества РНК отслеживали также только до пятых суток эксперимента, и было обнаружено, что количество РНК ВЖЛ оставалось на уровне дозы заражения и составляло 10^6 ГЭ/мл. По полученным результатам нельзя было сделать однозначный вывод о репликации вируса, поэтому для исключения ошибки нами был проведен аналогичный эксперимент, где эффекты от воздействия ВЖЛ оценивали до 10 суток. Значительного роста количества РНК ВЖЛ в культуральной жидкости Саран-2 зафиксировано не было, однако вплоть до 10-х суток уровень РНК сохранялся на уровне дозы заражения ($2 \cdot 10^6$ ГЭ/мл) несмотря на замену питательной среды. Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что штамм 17D ВЖЛ способен к репликации в клетках линии Саран-2, несмотря на отсутствие явных признаков ЦПД.

Вирус	17D ВЖЛ				
Клеточные линии	Сутки	3	5	7	10
MIAPaCa-2	ЦПД	++	++ ++	Нет наблюдений	
PANC-1		-	++		
Sarpan-2		-	-		
		-	-		

А



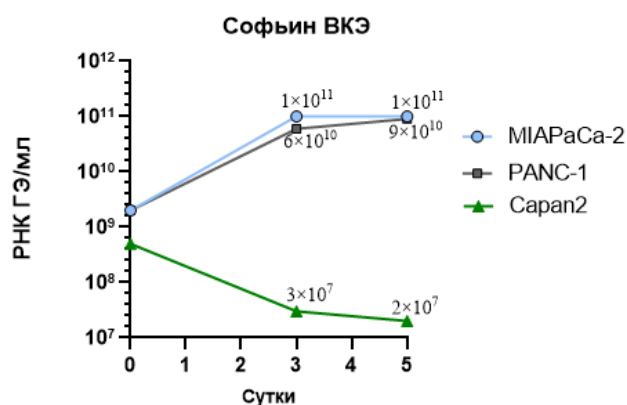
Б

Рисунок 25 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК ВЖЛ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании аденокарциномы поджелудочной железы MIAPaCa-2, PANC-1 и Sarpan-2 штаммом 17D ВЖЛ на 3, 5 и для Сарпан-2 на 7 и 10-е сутки эксперимента. Следует отметить, что во втором эксперименте на 5-е сутки в культуре Сарпан-2 производили замену среды

При исследовании цитопатического действия штамма Софьин ВКЭ были получены следующие результаты. При заражении клеток в титре 2×10^9 ГЭ/мл ($MOI = 1$) к пятым суткам в отношении клеточной линии MIAPaCa-2 ЦПД оценивали как 3 креста, в отношении клеточной линии PANC-1 как 1 крест, а для клеточной линии Сарпан-2 ЦПД обнаружено не было (Рисунок 26А). По результатам ПЦР количество вирусной РНК в культуральной среде MIAPaCa-2 и PANC-1 к пятым суткам было выше исходной (в момент заражения) практически на 2 порядка (10^{11} ГЭ/мл и 9×10^{10} ГЭ/мл соответственно). Для клеточной линии Сарпан-2 исходная доза заражения составляла 2×10^8 ГЭ/мл, и к пятым суткам количество РНК ВЖЛ уменьшалось на порядок (2×10^7 ГЭ/мл) (Рисунок 26).

Вирус	Софьин ВКЭ		
Клеточные линии	Сутки	3	5
MIAPaCa-2	ЦПД	++	++++
PANC-1		-	++
Sarpan-2		-	-

А



Б

Рисунок 26 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК

ВКЭ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании аденокарциномы поджелудочной железы МІАРaCa-2, PANC-1 и Саран-2 штаммом Софьин ВКЭ на 3 и 5 сутки эксперимента

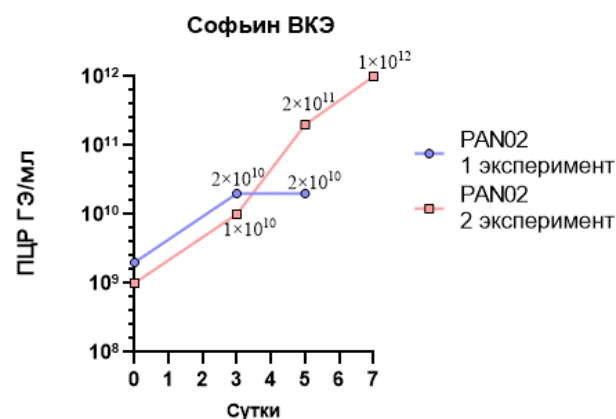
Ранее мы уже отмечали, что штамм Софьин ВКЭ способен эффективно реплицироваться в различных клеточных линиях, не оказывая при этом явного литического действия. Интересно, что для мышинной клеточной линии Pan02 мы получили схожие данные. При отсутствии ЦПД количество РНК ВКЭ возрастало на порядок (до $2 \cdot 10^{10}$ ГЭ/мл) (Рисунок 27) к третьим суткам эксперимента по сравнению с дозой заражения ($2 \cdot 10^9$ ГЭ/мл) и далее к пятым суткам не изменялось. Мы провели еще один эксперимент, где отслеживали эффекты от воздействия ВКЭ до седьмых суток. В отличие от других клеточных линий, изученных ранее, мы обнаружили ЦПД в 2 креста к седьмым суткам эксперимента, при этом количество РНК ВКЭ продолжало увеличиваться (до $1 \cdot 10^{12}$ ГЭ/мл) (Рисунок 27). Для более точной оценки наличия клеточного лизиса мы провели дополнительное исследование методом МТТ-теста. Через 7 суток инкубации с вирусом при $MOI = 1$ мы наблюдали 50% выживаемость Pan02, что совпадало с оценкой по ЦПД (Рисунок 28).

Полученные данные наглядно демонстрируют характерную особенность штамма Софьин ВКЭ: вирус способен активно размножаться в клетках, не проявляя немедленного литического действия. В случае культуры Pan02 спустя определённое время начинается развитие цитопатического эффекта, где активная репликация вируса предшествует появлению видимых признаков повреждения клеток.

Результаты исследований, представленные в разделе 3.1.5, опубликованы в работе [173].

Вирс		ВКЭ «Софьин»		
Клеточные линии	Сутки	3	5	7
PAN02	ЦПД, 1 опыт	-	-	Не исследовалось
	ЦПД, 2 опыт	-	-	++

А



Б

Рисунок 27 - Оценка (А) цитопатического действия и (Б) изменения количества вирусной РНК ВКЭ методом ПЦР в режиме реального времени в культуральной среде при инфицировании аденокарциномы поджелудочной железы мыши Pan02 штаммом Софьин ВКЭ на 3, 5 и 7-е сутки эксперимента. Следует отметить, что во втором эксперименте на 3-и сутки производили замену среды

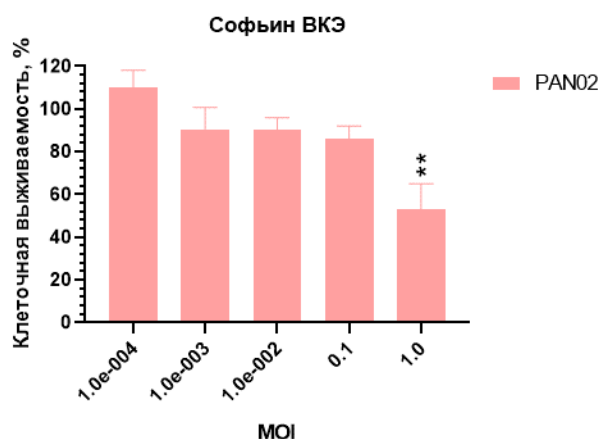


Рисунок 28 - Чувствительность клеточной линии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы мыши Pan02 к штамму Софьин ВКЭ на 7-е сутки эксперимента по результатам MTT-теста. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Отсутствие над значениями выживаемости P-value означает, что различия между инфицированными и неинфицированными клетками не являются статистически значимыми

Таким образом, результаты проведенных нами экспериментов показывают, что исследуемые флавивирсы оказывают онколитический эффект на протоковую аденокарциному поджелудочной железы человека. Следует отметить, что отсутствие литического действия на клеточную линию Saran-2 не уменьшает

перспективность использования флавивирусов. Мы в целом отметили высокую резистентность Саран-2 к разным ОВ, что подтверждают наши эксперименты со штаммами Индиана ВВС и Сэбина полиовируса 1 типа, а также другие исследования с ВПГ-1, вирусами миксомы и болезни Ньюкасла, которые эффективно лизируют различные клеточные линии аденокарциномы поджелудочной железы, но не Саран-2 [202–204]. Хорошим онколитическим действием в отношении Саран-2 обладают лишь вирусы коксаки и кори, однако даже их действие не приводит к полной клеточной гибели [205; 206]. Необходимо подчеркнуть, что ВЖЛ, по-видимому, способен к персистенции в Саран-2 на что указывают результаты ПЦР. Резистентность Саран-2, вероятно, связана с высокой активностью интерферона α и гена IRF7, который участвует в сигнальной системе интерферона [101]. Также можно объяснить высокую чувствительность MIAPaCa-2 к исследуемым вирусам отсутствием экспрессии IRF7 и интерферона-1, а умеренную чувствительность PANC-1 высоким уровнем экспрессии IRF7 и низким уровнем экспрессии интерферона-1 [101].

Учитывая, что PDAC до сих пор остается высоклетальным злокачественным заболеванием, требующим поисков новых противоопухолевых агентов, мы выбрали данную нозологию для дальнейшего изучения онколитического потенциала исследуемых вирусов. Особое внимание в данной работе мы решили уделить штамму 17D ВЖЛ, который имеет противоопухолевый потенциал в отношении PDAC. Преимуществом ВЖЛ перед другими онколитическими вирусами является тот факт, что вакцина на основе штамма 17D ВЖЛ широко используется в качестве профилактического средства для вакцинации людей против желтой лихорадки, что значительно упрощает возможную разработку стратегий иммунотерапии, включающих внутриопухолевые инъекции [57]. Также мы предполагаем, что иммуногенность ВЖЛ может играть положительную роль в терапии опухоли и приводить к ее лизису иммуноопосредованным образом [207]. Исходя из вышесказанного, мы приняли решение сконцентрировать дальнейшие исследования на изучении терапевтического потенциала штамма 17D ВЖЛ в контексте лечения PDAC.

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

3.2.1 Исследование онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на модели MIAPaCa-2

Использование современной системы прижизненного мониторинга клеточной пролиферации xCELLigence Real-TimeCell Proliferation Measurement (xCELLigence) (Agilent Technologies, США) позволило нам отследить динамику цитопатического эффекта, вызываемого ВЖЛ. При оценке онколитического действия вируса на 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 по истечении трех суток после заражения: клетки, инфицированные ВЖЛ, начинают открепляться, что сопровождается снижением показателя клеточного индекса, и к пятым суткам эксперимента живых клеток не остается (Рисунок 29). Очевидно, что ВЖЛ требуется время на аккумуляцию внутри клетки прежде, чем это будет критическим фактором для ее жизненных функций.

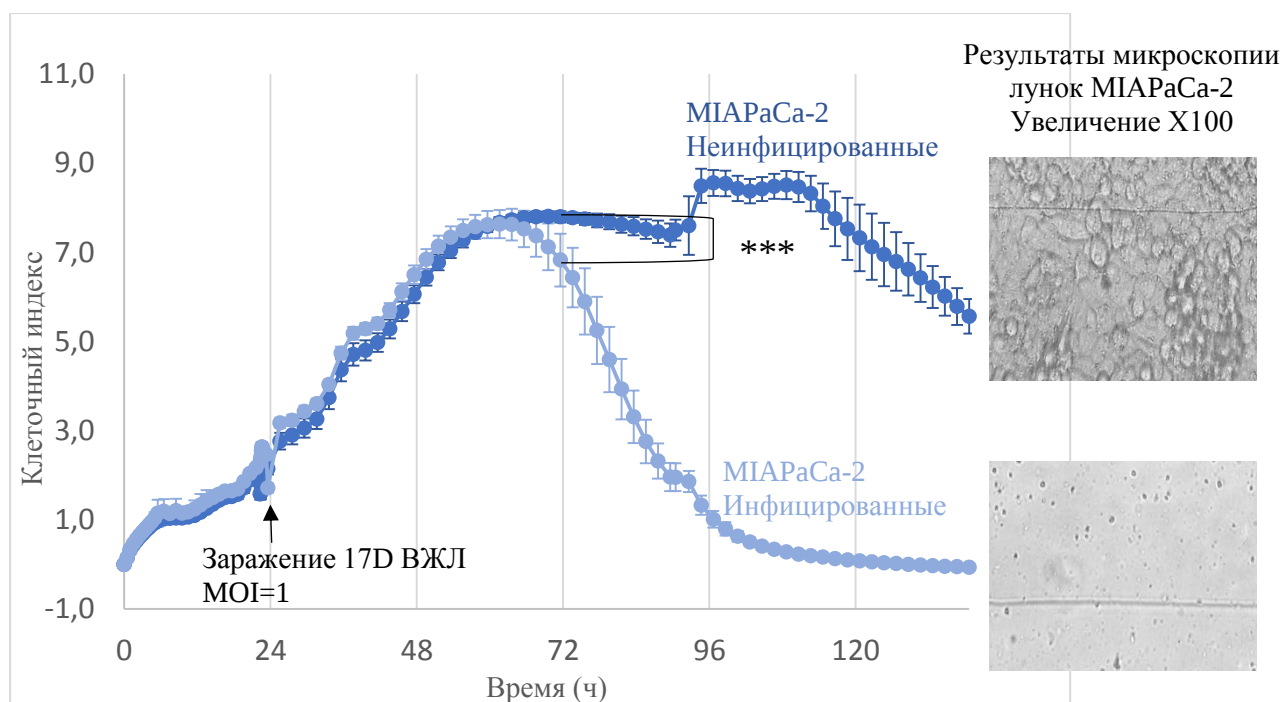
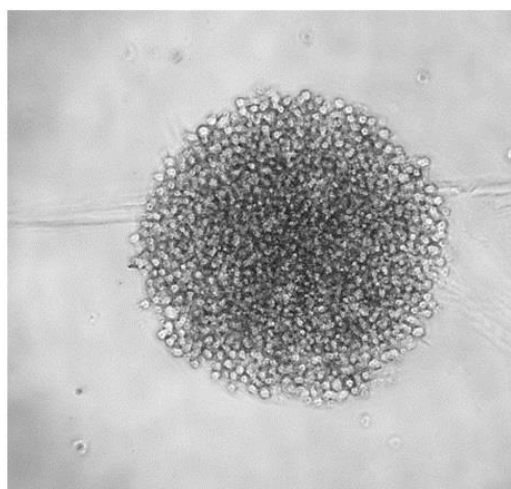


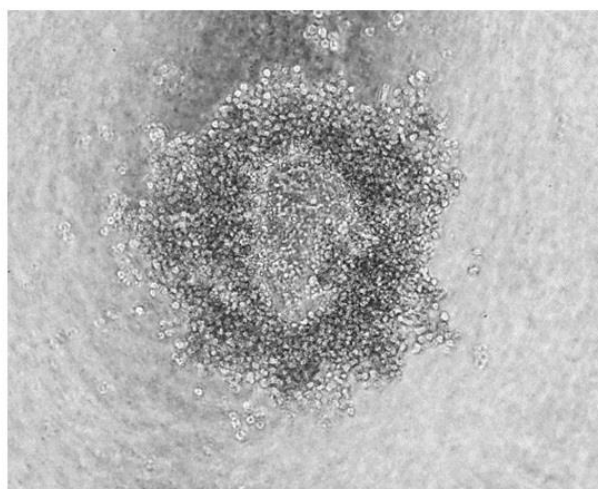
Рисунок 29 - Оценка онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на клеточную линию

МІАРСа-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 многоклеточных опухолевых сфероиды, которые воспроизводят ключевые характеристики солидных опухолей. Использование сфероидов в качестве экспериментальной модели даёт возможность исследовать не только поверхностное взаимодействие вируса с опухолевыми клетками, но и оценить его способность преодолевать барьеры трёхмерной структуры опухоли. В ходе эксперимента мы использовали агарозные формы для культивирования клеток МІАРСа-2, и уже через трое суток удавалось наблюдать формирование сфероидов размером около 650 мкм. Затем сфероиды инфицировали ВЖЛ в титре 10^6 БОЕ/мл, и на третьи сутки после заражения мы наблюдали разрушение сфероидов, потерю их нативной структуры (Рисунок 30). Эти наблюдения демонстрируют способность ВЖЛ проникать в толщу опухолевой массы и вызывать существенные структурные изменения в трёхмерных опухолевых моделях.



А



Б

Рисунок 30 - Оценка онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на тканевых сфероиды МІАРСа-2 на 3-и сутки эксперимента. (А) Неинфицированный сфероид. (Б) Разрушенный сфероид в результате действия ВЖЛ

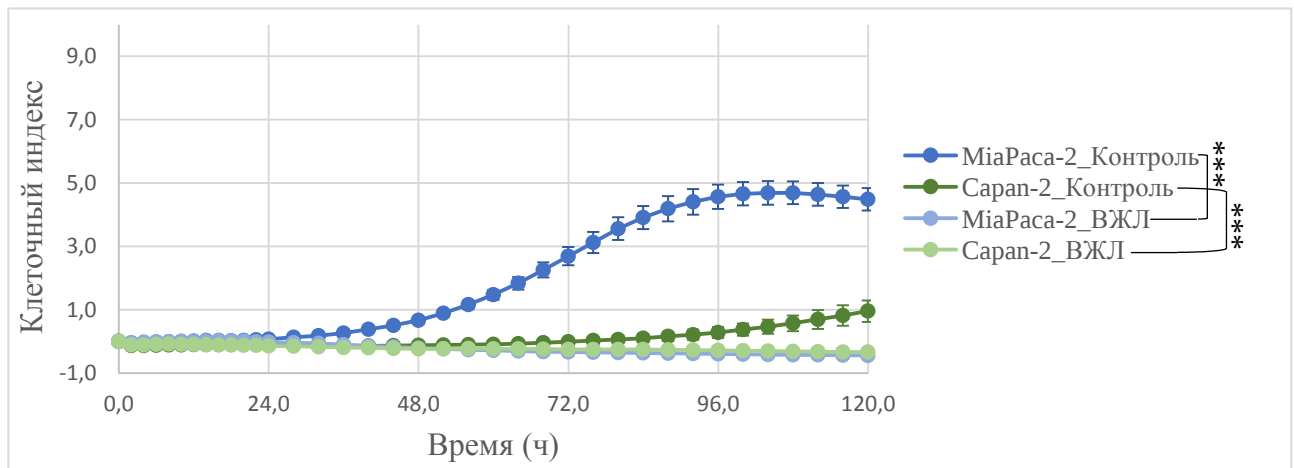
Способность ВЖЛ проникать между плотными контактами опухолевых клеток вглубь солидных опухолей наряду с высокой литической активностью вируса в отношении клеток МІАРСа-2 делают штамм 17D ВЖЛ хорошим

кандидатом в противоопухолевые агенты для лечения PDAC. Однако, для более полной оценки онколитического потенциала вируса необходимы эксперименты *in vivo*. В качестве модели для таких исследований нами была выбрана мышьяная клеточная линия Pan02, которая при имплантации мышам C57BL/6 формирует сингенную модель PDAC. Эта модель широко применяется в доклинических исследованиях и зарекомендовала себя как надёжный инструмент для изучения вирусного онколиза. Кинетика роста опухоли после подкожной имплантации клеток Pan02 позволяет использовать более чем трёхнедельное терапевтическое окно для оценки онколитического действия исследуемых методов лечения [171]. Такой подход позволит получить более полное представление о возможностях применения ВЖЛ в качестве онколитического агента.

3.2.2 Оценка чувствительности клеточной линии Pan02 к штамму 17D вируса желтой лихорадки

Как уже упоминалось ранее, результаты МТТ-теста первоначально показали отсутствие прямого онколитического действия ВЖЛ на клеточную линию Pan02 (раздел 3.1.5.). Однако, при использовании системы xCELLigence было продемонстрировано, что ВЖЛ (штамм 17D) оказывает ЦПД, которое связано с замедлением клеточного роста Pan02, а не с прямым лизисом клеток (Рисунок 31). При высокой вирусной нагрузке ($MOI = 100$) пролиферация Pan02 подавляется, но в отличие от человеческих MIAPaCa-2, PANC-1 и Саран-2, не полностью. Сохранение резистентных клеток Pan02 может привести к вторичному формированию монослоя и элиминации вируса, что, возможно, требует дополнительного инфицирования вирусом.

А



Б

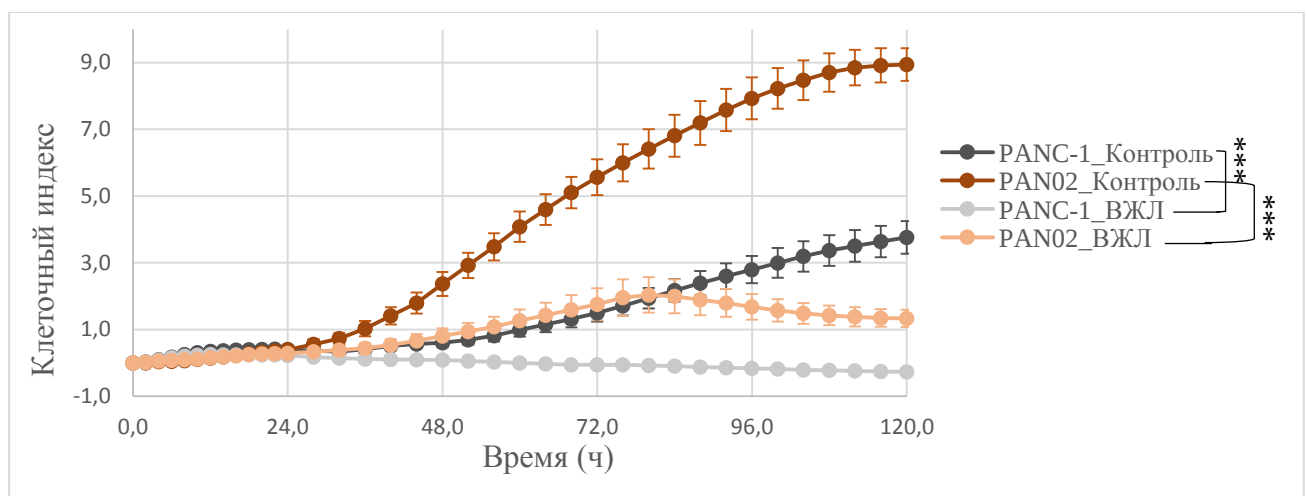
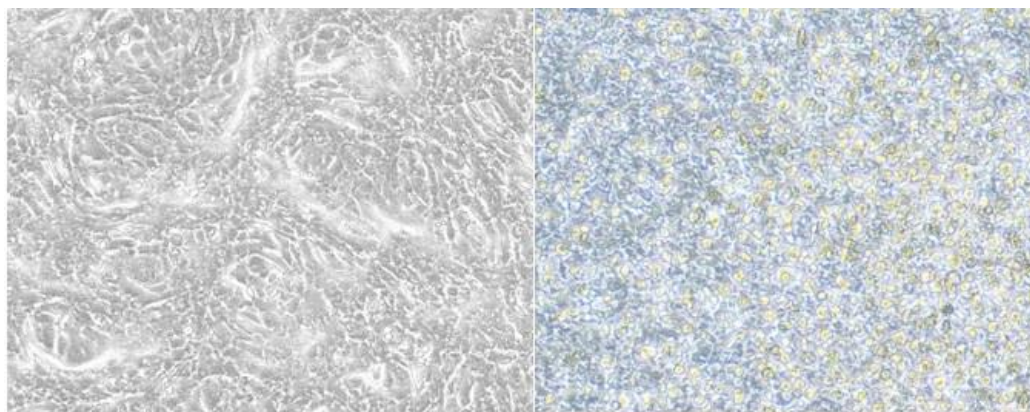


Рисунок 31 – Оценка онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на клеточные линии PDAC при MOI = 100. А) Культуры MIAPaCa-2 и Capan-2. (Б) Культуры PANC-1 и Pan02. Кривые пролиферации клеток PDAC в реальном времени получены с помощью xCELLigence. Статистическая оценка была проведена с использованием двустороннего t - критерия Стьюдента

Также мы заметили морфологические изменения монослоя у инфицированных ВЖЛ клеток по сравнению с незараженными клетками Pan02. При длительной инкубации неинфицированные клетки Pan02 с условием регулярной замены питательной среды сохраняли межклеточные контакты и активно пролифировали (Рисунок 32А). Напротив, инфицированные клетки Pan02 имели необычную морфологию: клетки округлялись и имели аномальную форму, однако разрушения монослоя при этом не наблюдалось (Рисунок 32Б). Через трое суток после инфицирования мы измерили количество открепившихся клеток в культуральной среде. В инфицированной культуре мы зафиксировали

$4,02 \cdot 10^4$ мёртвых клеток/мл, тогда как в контрольной культуре количество погибших клеток было ниже — всего $5,74 \cdot 10^3$ мертвых клеток/мл.

Помимо этого, через трое суток после заражения мы оценили пролиферативную активность инфицированных и контрольных клеток с помощью xCELLigence (Рисунок 33). Так, в течение 24 часов инфицированные клетки Pan02 продолжали активно делиться, демонстрируя пролиферативную активность, сходную с неинфицированными клетками. Однако спустя 33 ч наблюдалось ингибирование роста клеток, не приводящее к последующей деградации монослоя. Этот эффект может быть обусловлен связыванием вирионов с мембранными рецепторами клетки без последующего рецептор-опосредованного эндоцитоза и репликации вируса. Наше предположение было основано на том факте, что некоторые вирусы способны индуцировать апоптоз еще до проникновения в клетку — посредством взаимодействия с рецепторами на поверхности клетки, что приводит к активации сигнальных путей, запускающих клеточную гибель [208].



А

Б

Рисунок 32 - Микроскопия клеток Pan02 через 3-е суток после заражения при увеличении $\times 40$. (А) Неинфицированные (контрольные клетки). (Б) Инфицированные ВЖЛ клетки

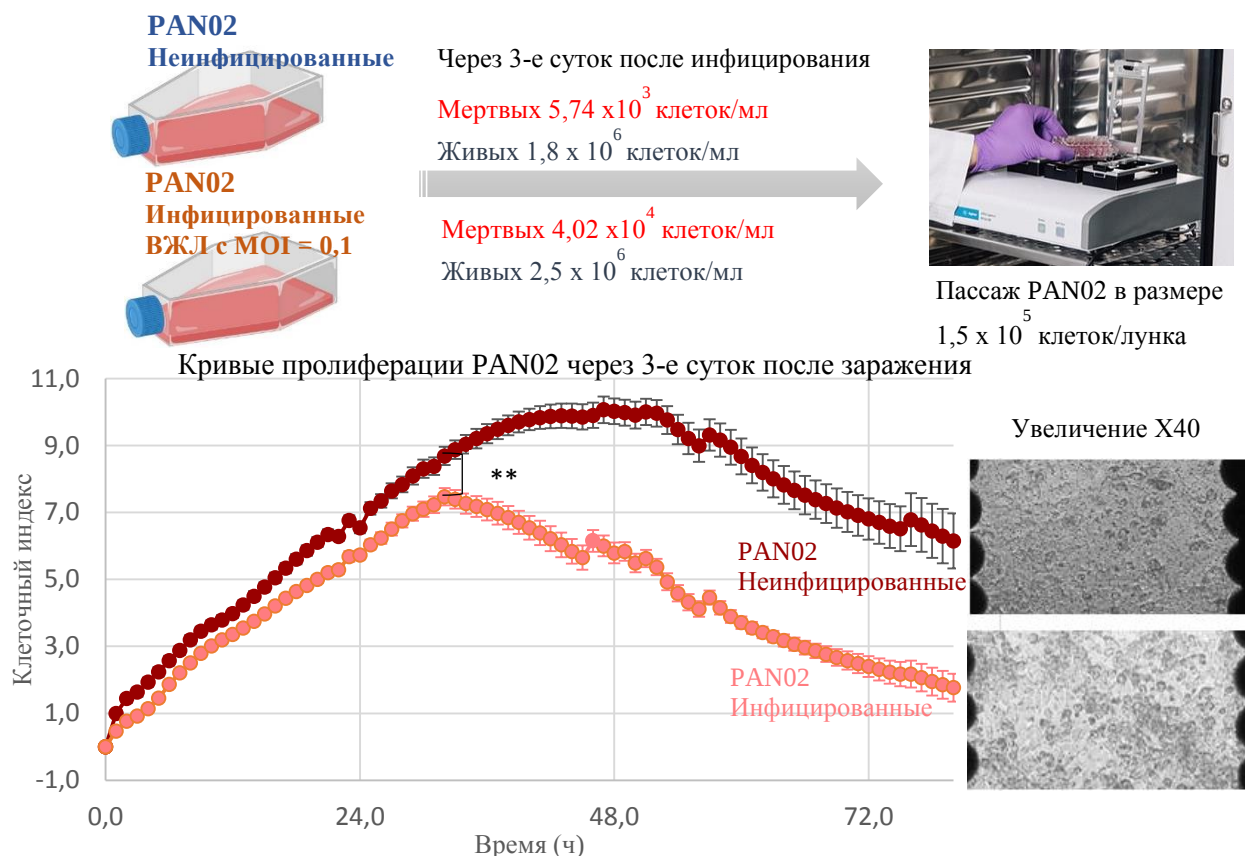


Рисунок 33 - Оценка онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на клеточную линию Pan02 с помощью системы xCELLigence. По схеме эксперимента Pan02 в культуральном флаконе заражали ВЖЛ с MOI = 0,1 (10^6 БОЕ/мл), и через трое суток измеряли количество мертвых клеток в зараженной и незараженной культуре, после чего производили пассаж клеток в размере $1,5 \times 10^5$ клеток/лунка на планшет для измерения пролиферации. Статистическая оценка была проведена с использованием двустороннего t - критерия Стьюдента

Для того, чтобы оценить способность вируса к персистенции в Pan02, мы провели аналогичный эксперимент на системе xCELLigence, в котором производили замену питательной среды каждые 48 ч и забор проб культуральной жидкости для оценки изменения количества РНК ВЖЛ методом ПЦР. Мы обнаружили, что пролиферация инфицированных ВЖЛ клеток Pan02 изначально была подавлена, однако замена питательной среды через 48 ч после заражения приводила к исчезновению цитопатического эффекта, при этом полной элиминации вирусной РНК не наступало (Рисунок 34). Исходная доза заражения определялась на уровне 10^5 ГЭ/мл и оставалась примерно на том же уровне через 3-е суток после заражения (5×10^5 ГЭ/мл). После пассажа клеток и культивирования их в течение 48 ч мы наблюдали падение количества вирусной РНК (8×10^3 ГЭ/мл),

однако еще через 120 ч культивирования с дважды произведенной заменой поддерживающей среды вирусная РНК не только обнаруживалась, но и ее количество немного увеличилось ($4 \cdot 10^4$ ГЭ/мл) (Рисунок 34). Дополнительные эксперименты подтвердили способность вируса к персистенции в клетках Pan02. В одном из исследований было показано, что вирусная РНК сохраняется примерно на уровне исходной дозы заражения (10^5 ГЭ/мл) даже после 13 суток культивирования ($5 \cdot 10^4$ ГЭ/мл), несмотря на регулярную замену питательной среды (Таблица 2). Более того, в другом эксперименте было обнаружено, что не только РНК ВЖЛ, но и сам инфекционный вирус сохранялись в клетках Pan02 даже после трёх последовательных пассажей (Таблица 3).

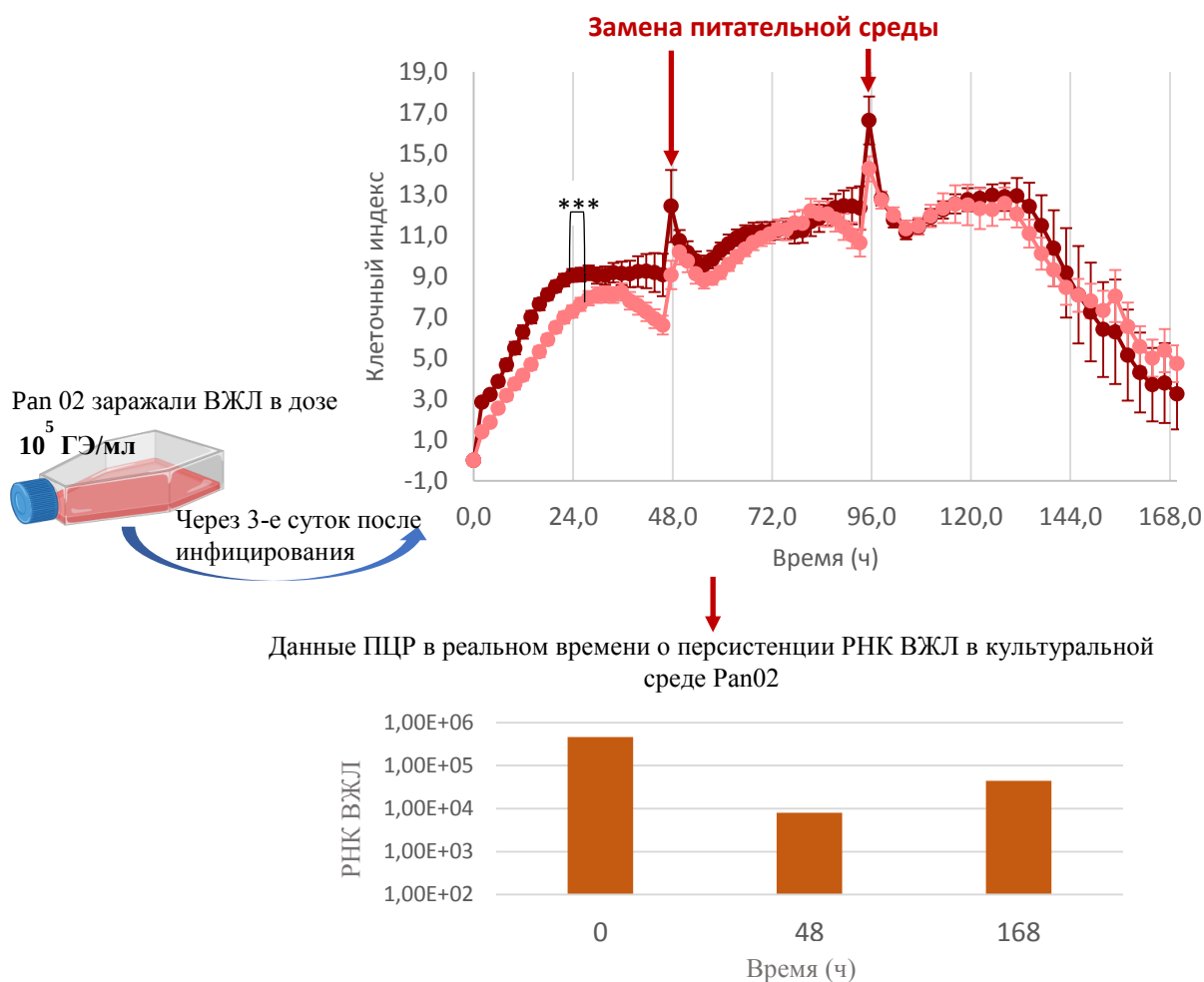


Рисунок 34 - Оценка онколитического действия штамма 17D ВЖЛ на клеточную линию Pan02 с помощью системы xCELLigence и методом ПЦР в режиме реального времени. По схеме эксперимента клетки Pan02 заражали ВЖЛ в дозе 10^5 ГЭ/мл ($MOI = 0,1$), инкубировали в течение 3 суток, после чего производили пассаж с целью наблюдения за пролиферативной способностью инфицированных и неинфицированных клеток еще в течение 7 суток. Через 48 и 96 ч после

пассажа клеток производили замену среды. Количество вирусной РНК оценивали через 0, 48 и 168 часов после пассажа клеток

Таблица 2 - Изменение количества вирусной РНК ВЖЛ в культуральной среде и клетках при инфицировании клеточной линии Рап02 на 3, 5, 7, 10 и 13-е сутки эксперимента. Во втором эксперименте на 3, 7 и 10-е сутки производили замену среды (закрашенные ячейки)

Опыт	Образец	Сутки					
		0	3	5	7	10	13
1	Культуральная жидкость, ГЭ/мл	10^6	$3 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^5$	Не исследовалось		
2	Культуральная жидкость, ГЭ/мл	10^5	$7 \cdot 10^4$	Не исследовалось	$3 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$
2	Клетки, ГЭ/мл	Не исследовалось				$4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$

Таблица 3 - Данные ПЦР в режиме реального времени и анализа БОЕ по персистенции РНК ВЖЛ в клетках Рап02 при инфицировании на 3-и сутки эксперимента и после 3-х пассажей

Метод исследования	Пассаж / Сутки				
	0	0 / 3	1 / 1	2 / 1	3 / 3
БОЕ, БОЕ/мл	$2,5 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	10^3	$3 \cdot 10^2$
ПЦР, ГЭ/мл	10^6	10^6	$4,5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	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) [209]. Клетки Рап02, МІАРаса-2 и PANC-1 были инфицированы живым штаммом 17D ВЖЛ, меченным DiD, в то время как инактивированный формалином вирус, меченный DiD, служил в качестве отрицательного контроля. Через 2 часа инкубации клеток с инфекционным вирусом мы наблюдали флуоресцентные сигналы, указывающие на события слияния клеточной и вирусной мембран (Рисунок 35А), при этом при взаимодействии клеток с инактивированным вирусом флуоресцентный сигнал практически отсутствовал (Рисунок 35Б). Следует отметить, что интенсивность флуоресценции, указывающая на слияние

ВЖЛ с клеткой, была ниже в клетках Pan02 по сравнению с клетками MIAPaCa-2 и PANC-1 человека.

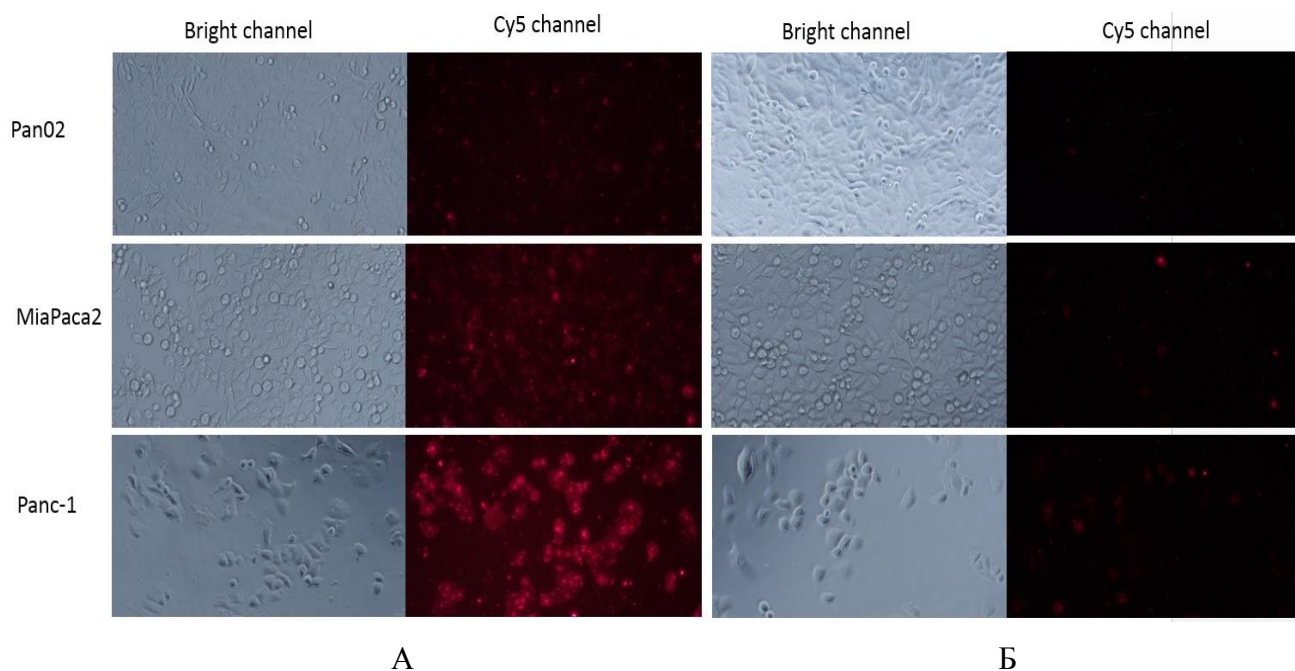


Рисунок 35 - Слияние клеточных мембран Pan02, MIAPaCa-2 и PANC-1 с ВЖЛ-DiD после 2-х часов инкубации. (А) Инфекционный вирус, (Б) инактивированный формалином вирус. Микроскопия клеток при 200-кратном увеличении

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что ВЖЛ (штамм 17D) способен к персистенции в клеточной линии Pan02 и ингибированию ее роста. Репродукция вируса непосредственно в опухолевой ткани создаёт условия для преодоления иммуносупрессии, характерной для опухолевого микроокружения. Это открывает дополнительный терапевтический потенциал: даже при отсутствии прямого литического действия на клетки линии Pan02, ВЖЛ может способствовать ингибированию роста или деградации опухолевой массы иммуноопосредованным образом [3]. Учитывая эти результаты, мы решили провести дальнейшие исследования для оценки иммуномодулирующего потенциала ВЖЛ на животной модели. Это позволит полноценно оценить, как вирус влияет на иммунную систему организма в условиях реальной опухоли и может ли его репродукция действительно способствовать усилению противоопухолевого иммунного ответа.

3.3 Исследование онколитических эффектов штамма 17D вируса желтой лихорадки на сингенной модели протоковой аденокарциномы поджелудочной железы Pan02

3.3.1 Оценка онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на протоковую аденокарциному поджелудочной железы Pan02 при однократном внутриопухолевом введении вируса

Для проведения эксперимента по оценке онколитического действия ВЖЛ на животной модели мы использовали мышей линии C57BL/6-SPF (SPF-виварий, ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ). Для формирования опухолей подкожно в правое бедро животных вводили $5,2 \times 10^5$ клеток Pan02 в 100 мкл PBS, и к десятому дню после имплантации клеток новообразования достигали размера 5-7 мм в диаметре. В этот момент 8 мышам (группа для виротерапии) интратуморально вводили 10^6 БОЕ/100 мкл штамма 17D ВЖЛ, а 8 другим мышам (контрольная группа) интратуморально вводили 100 мкл культуральной жидкости DMEM-VERO, полученной в результате культивирования клеточной линии Vero (Рисунок 36). По достижении гуманной конечной точки мышей подвергали эвтаназии, после чего проводили вскрытие, забор образцов крови и опухолевых тканей.

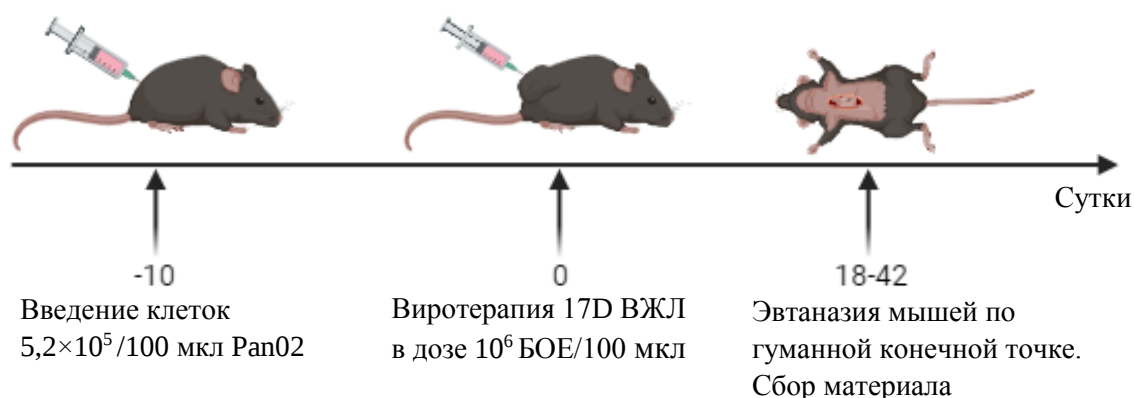


Рисунок 36 - Схема эксперимента однократной виротерапии ВЖЛ мышей с опухолями Pan02

Внутриопухолевое введение штамма 17D ВЖЛ привело к замедлению роста опухоли и увеличению выживаемости на 30% (медиана составила 30 дней) по сравнению с контрольной группой (медиана составила 23 дня). При этом

максимальная продолжительность жизни мышей в группе с виротерапией составляла 42 дня против 25 дней в контрольной группе (Рисунок 37). Однократная внутриопухолевая инъекция ВЖЛ хорошо переносилась мышами, и существенных изменений в состоянии здоровья по сравнению с контрольной группой не наблюдалось. Параметры общего анализа крови оставались в пределах референсных значений (в соответствии со стандартами центра разведения Charles River), потери веса не наблюдалось до последней недели, предшествующей гуманной конечной точке. В группе с виротерапией у некоторых мышей в течение первых 7 дней после инъекции образовался отек в области опухоли, что затрудняло точное измерение новообразования в этот период. Через 7-12 дней отек спадал, опухоли уплотнялись, и в последующем мы наблюдали замедленный рост опухолей по сравнению с контролем (Рисунок 38).

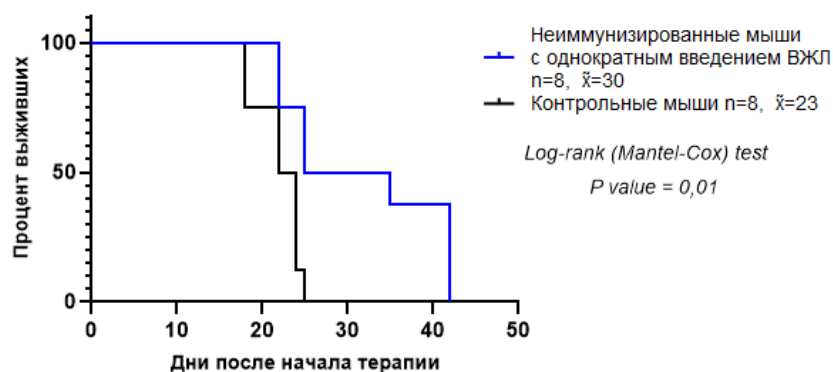
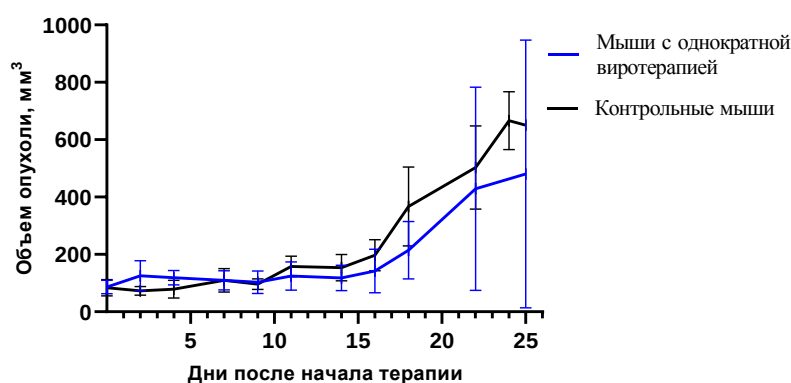
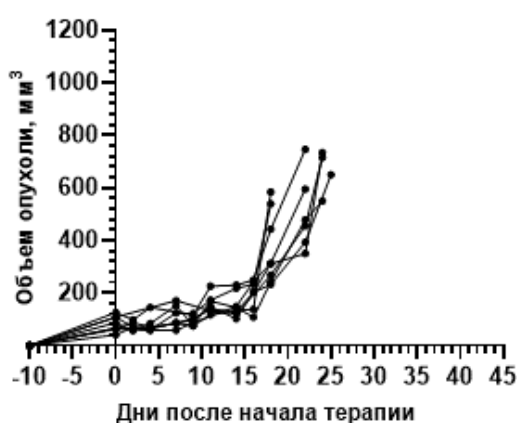


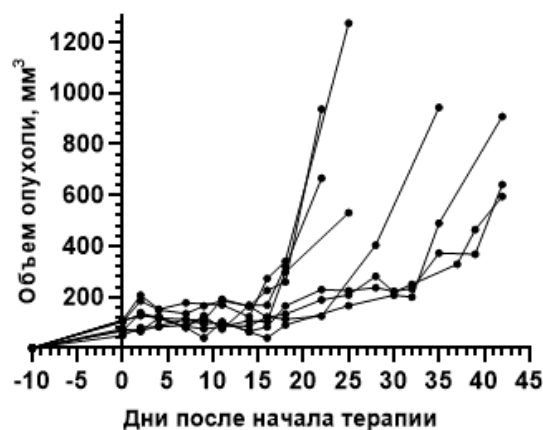
Рисунок 37 - Анализ выживаемости Каплана-Майера с однократной виротерапией мышей штаммом 17D ВЖЛ. Полученные данные были статистически оценены методом Мантела-Кокса



А



Б



В

Рисунок 38 - Графики роста опухолей в зависимости от времени эксперимента в опыте с однократной вирусотерапией. (А) Общий график увеличения объема опухолей контрольных мышей и мышей с вирусотерапией ВЖЛ, (Б) график увеличения объема опухолей у контрольной группы мышей (n=8), (В) график увеличения объема опухолей у группы мышей с вирусотерапией ВЖЛ (n=8)

Гистологическое исследование опухолей было проведено сотрудником ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России - д.м.н. Демяшкиным Григорием Александровичем. Анализ опухолей, полученных от контрольной группы мышей, выведенных из эксперимента на 25-й день, показал, что паренхима аденокарциномы представлена плотно упакованными, местами рыхло расположенными атипичными клетками, преимущественно эпителиоидного (гландулярного) типа, где были видны фигуры митозов и гибель единичных клеток путём апоптоза (Рисунок 39А). Также следует отметить, что у контрольной группы

регионарные лимфатические узлы не были увеличены (Рисунок 39Б) и метастазы не обнаруживались. В группе с виротерапией были проанализированы фрагменты опухолей мышеч, выведенных из эксперимента на 25, 35 и 42 сутки. 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, по-видимому, усилился (Рисунок 39А). Гистологических различий в лимфатических узлах между двумя группами не было, и метастазы также не были обнаружены (Рисунок 39Б).

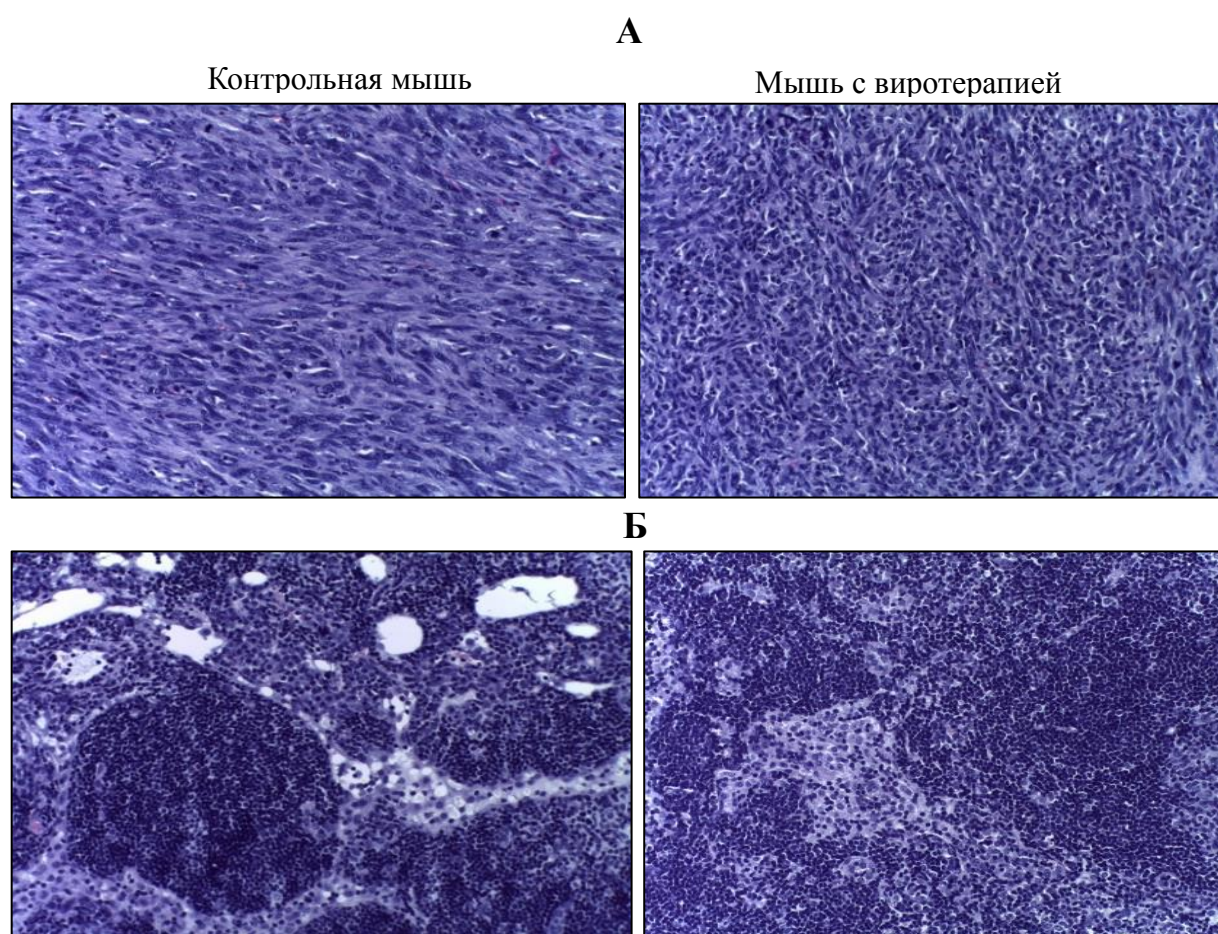


Рисунок 39 - Гистологическое исследование опухолей в контрольной группе и группе с однократной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. Окрашено гематоксилином и эозином; увеличение $\times 200$. (А) Фрагмент аденокарциномы Рап02 на 25-й день от контрольной мыши (слева) и мыши с виротерапией ВЖЛ (справа). (Б) Фрагмент регионарного лимфатического узла у мышеч с Рап02 контрольной группы и группы с однократной виротерапией, подвергнутых эвтаназии на 25-й день (слева) и 35-й день (справа)

Проведённое исследование показало неоднозначные результаты в отношении эффективности виротерапии при лечении опухолей Pan02. Хотя и наблюдалась определённая положительная динамика в виде замедления роста новообразований у мышей, получавших вирусную терапию, полученные результаты свидетельствуют о недостаточной эффективности однократной внутриопухолевой инъекции штамма 17D ВЖЛ для неиммунизированных животных. Мы сделали такой вывод из-за данных гистологического анализа, которые лишь подтвердили усиление опухолевого роста. Поскольку в условиях *in vitro* мы также не наблюдали деградацию монослоя за счет действия только лишь вируса, возможно, что предварительная иммунизация мышей с последующим введением ВЖЛ поможет усилить инфильтрацию опухоли иммунными клетками и способствовать активации противоопухолевого иммунитета.

3.3.2 Оценка онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на протоковую аденокарциному поджелудочной железы Pan02 при условии предварительной иммунизации мышей

Для изучения онколитического эффекта ВЖЛ через активацию иммунных механизмов мы опирались на результаты ранее опубликованных исследований, в которых Aznar и др. на модели подкожных опухолей MC38 и B16-OVA показали, что штамм 17D ВЖЛ обладает усиленным противоопухолевым действием после предварительной иммунизации, и авторы предполагают, что этот эффект достигается за счет действия CD8⁺ Т-клеток [14]. Мы иммунизировали мышей штаммом 17D ВЖЛ в дозе 10⁶ БОЕ/100 мкл путем подкожной инъекции в основание хвоста (Рисунок 40). 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 после формирования опухоли размером 5–7 мм интратуморально вводили 10⁶ БОЕ/100 мкл штамма 17D ВЖЛ (группа

виротерапии) и 100 мкл культуральной жидкости DMEM-VERO (контрольная группа) (Рисунок 40).

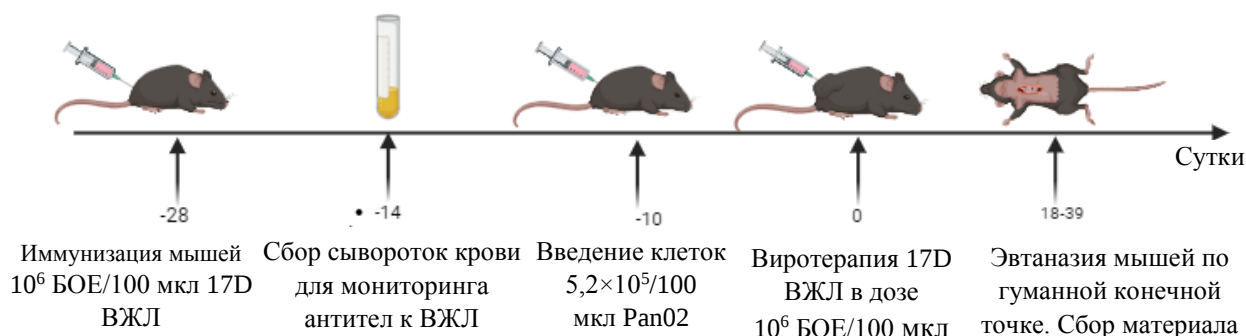


Рисунок 40 - Схема эксперимента однократной виротерапии 17D ВЖЛ иммунизированных мышей с опухолями Pan02

С точки зрения кинетики роста, терапия ВЖЛ оказала более выраженный положительный эффект на иммунизированных мышей, и привела к увеличению выживаемости на 56% (медиана выживаемости составила 36 дней против 23 в контрольной группе) (Рисунок 41). Помимо этого, разница в росте опухолей иммунизированных и контрольных мышей к 25-м суткам эксперимента была более значительна, чем в случае терапии неиммунизированных мышей (Рисунок 42). Мыши хорошо перенесли как иммунизацию, так и последующую однократную интратуморальную инъекцию ВЖЛ. Показатели общего анализа крови оставались в пределах референсных значений, и потери веса не наблюдалось до последней недели перед достижением гуманной конечной точки.

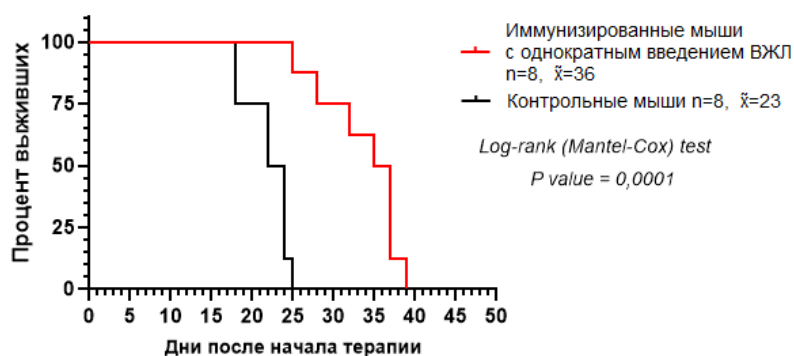


Рисунок 41 - Анализ выживаемости Каплана-Майера иммунизированных мышей с однократной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. Полученные данные были статистически оценены методом Мантела-Кокса

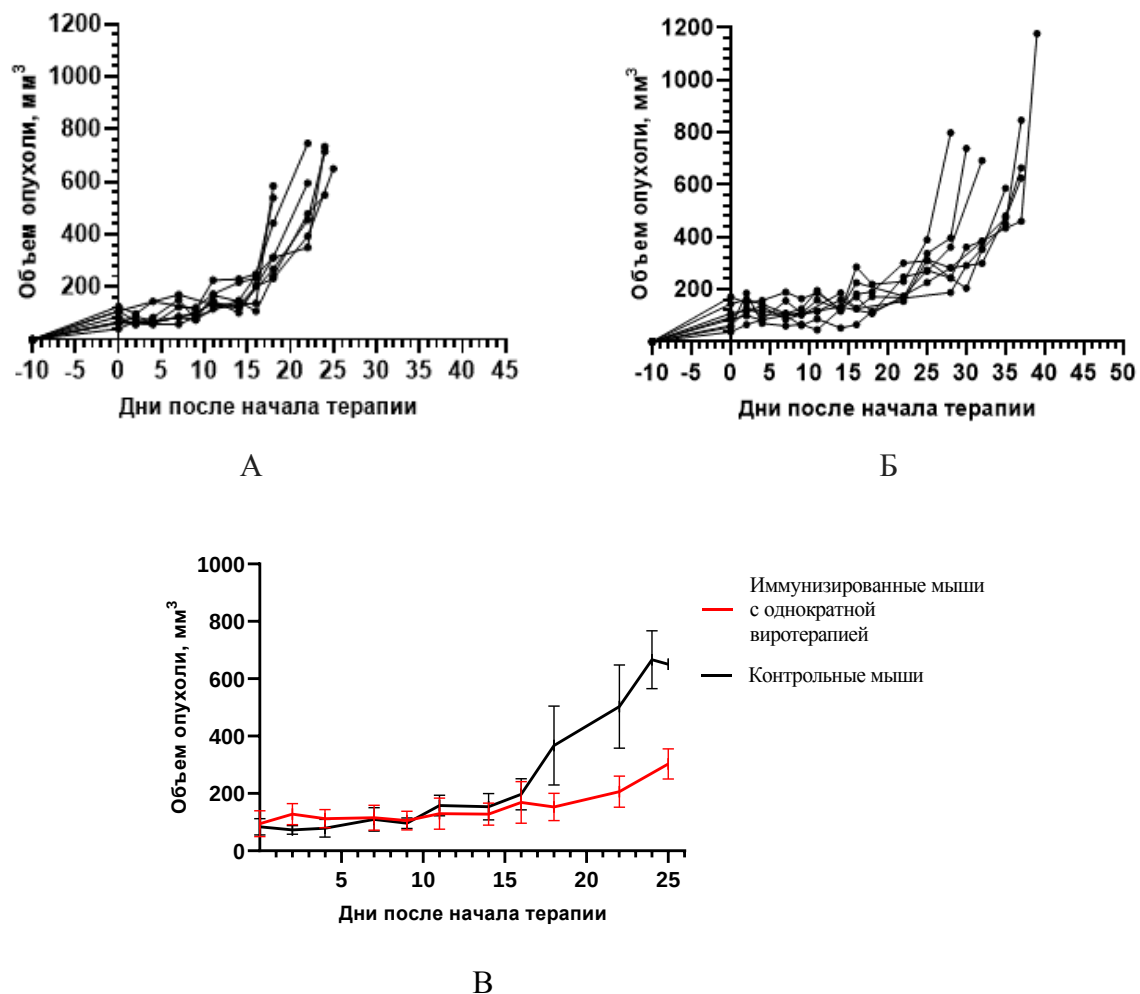
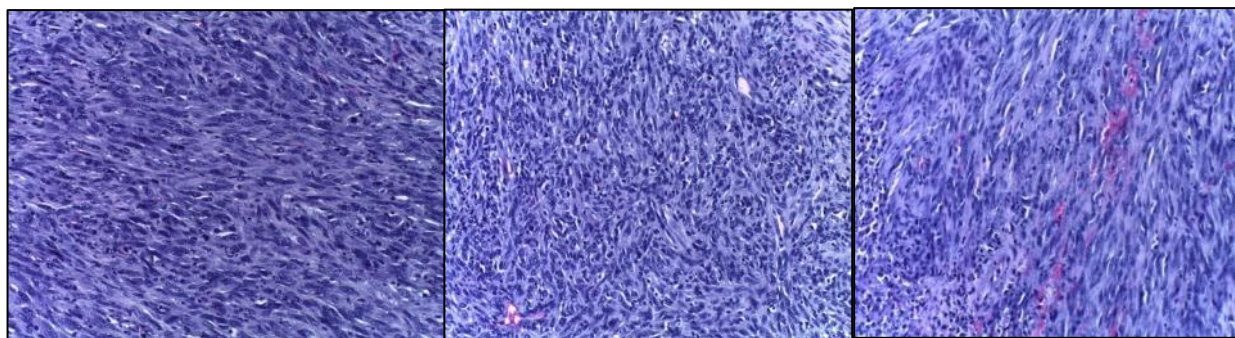


Рисунок 42 - Графики роста опухолей в зависимости от времени эксперимента в опыте с однократной виротерапией иммунизированных мышей. (А) График увеличения объема опухолей у контрольной группы мышей (n=8), (Б) график увеличения объема опухолей у группы иммунизированных мышей с виротерапией ВЖЛ (n=8), (В) общий график роста опухолей контрольных мышей и иммунизированных мышей с виротерапией ВЖЛ

Гистологическое исследование опухолей, полученных от иммунизированных мышей с виротерапией и подвергнутых эвтаназии на 25-е сутки эксперимента, выявило умеренную воспалительную мононуклеарную инфильтрацию в паратуморальной зоне, а также очаги некроза и апоптоза атипичных клеток в паренхиме аденокарциномы (Рисунок 43Б). В контрольной группе подобных изменений не наблюдалось (Рисунок 43А). Однако, у мышей из группы виротерапии, подвергнутых эвтаназии на 35-е сутки, наблюдалась менее выраженная воспалительная мононуклеарная инфильтрация и более крупные очаги гибели клеток (Рисунок 43В). Опухоли имели преимущественно трабекулярно-фасцикулярную структуру, в отличие от солидных опухолей неиммунизированных

мышей, получавших виротерапию. Состояние лимфатических узлов у мышей, получавших виротерапию, не отличалось от мышей в контрольной группе.



А

Б

В

Рисунок 43 - Гистологическое исследование опухолей в контрольной группе и группе иммунизированных мышей с однократной виротерапией 17D ВЖЛ. Окрашивание гематоксилином и эозином; увеличение $\times 200$. (А) Фрагмент аденокарциномы Рап02 от контрольной мыши, выведенной из эксперимента на 25-й день. (Б) Фрагмент аденокарциномы Рап02 иммунизированной мыши с виротерапией ВЖЛ, выведенной из эксперимента на 25-й день. (В) Фрагмент аденокарциномы Рап02 иммунизированной мыши с виротерапией ВЖЛ, выведенной из эксперимента на 35-й день

Результаты экспериментов показали, что сочетание предварительной иммунизации штаммом 17D ВЖЛ с последующей виротерапией даёт более выраженный терапевтический эффект. Мы наблюдали существенную задержку роста опухоли и увеличение медианы выживаемости по сравнению с терапией неиммунизированных мышей. Помимо этого, гистологический анализ новообразований иммунизированных мышей с виротерапией показал присутствие очагов гибели атипичных клеток, изменение структуры опухоли с солидного типа (неиммунизированные мыши) на более «рыхлый» трабекулярно-фасцикулярный тип, а также была обнаружена воспалительная мононуклеарная инфильтрация в паратуморальной зоне, чего не наблюдалось в случае виротерапии неиммунизированных мышей. Эти изменения указывают на развитие деструктивных процессов в опухолевой ткани, и с учетом отсутствия у ВЖЛ способности к прямому лизису клеток Рап02 и низкой эффективности терапии неиммунизированных мышей, мы предполагаем, что задержка роста опухоли происходила не только за счет ингибирования роста клеток Рап02 ВЖЛ, но также и иммуноопосредованным способом. В последующем, мы решили оценить

действие штамма 17D ВЖЛ на опухоли Рап02 при условии многократного введения вируса, что, возможно, повысит эффективность терапии.

3.3.3 Оценка онколитического действия штамма 17D вируса желтой лихорадки на протоковую аденокарциному поджелудочной железы Рап02 при условии многократного введения вируса

Следующим этапом нашего исследования стало изучение влияния штамма 17D ВЖЛ на противоопухолевую активность после многократного введения вируса. 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 (Рисунок 44).

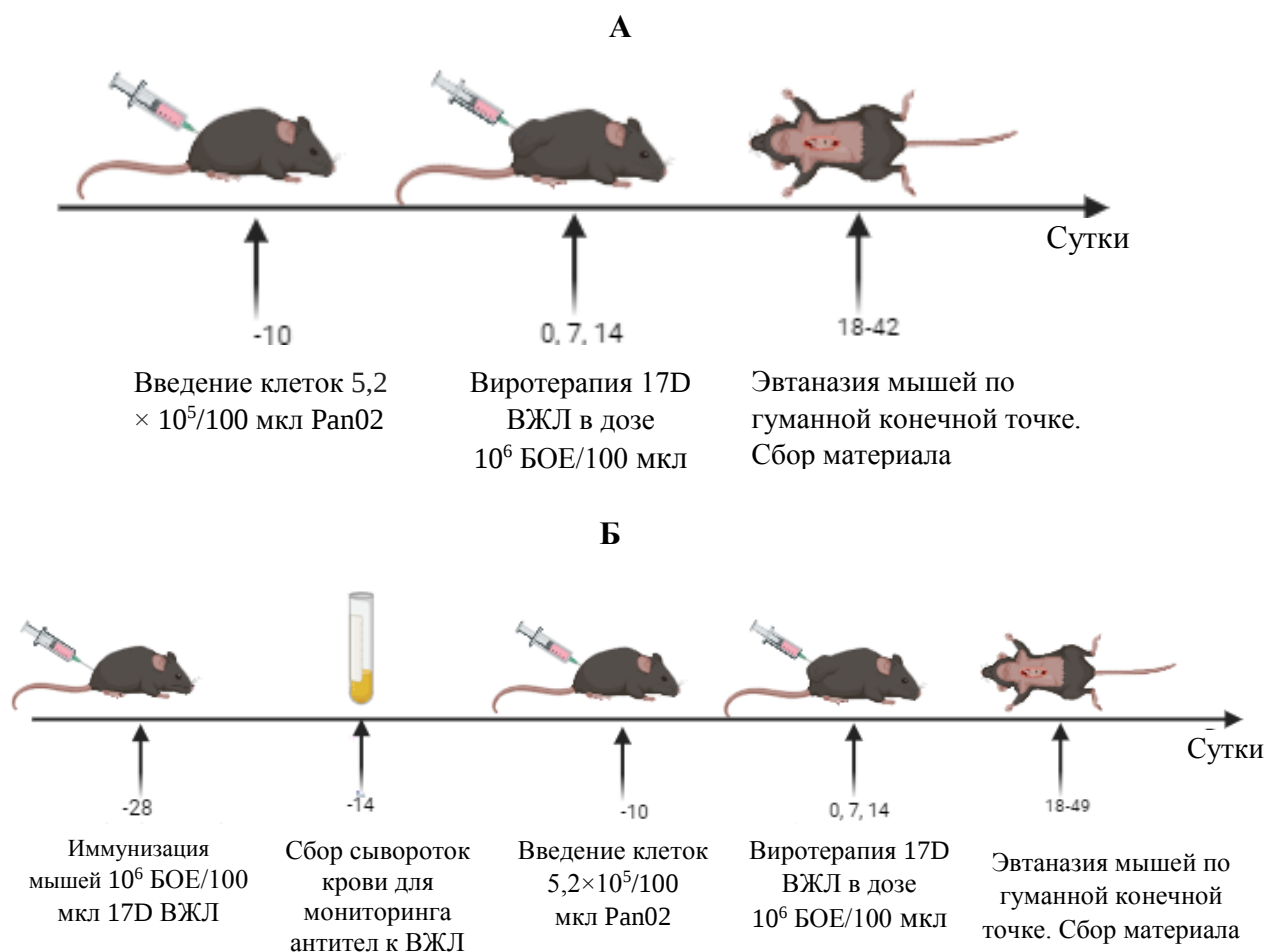


Рисунок 44 – Схема эксперимента многократной (трехкратной) виротерапии 17D ВЖЛ (А) неиммунизированных и (Б) иммунизированных мышей с опухолями Рап02

По результатам эксперимента у неиммунизированных мышей трехкратное введение вируса увеличивало выживаемость лишь на 15% (медиана выживаемости составила 27 дней) по сравнению с контрольной группой (медиана выживаемости составила 23 дня) (Рисунок 45), и рост опухолей в экспериментальной группе к 25-му дню был немногим меньше, чем в контрольной группе (Рисунок 46А). При этом, по сравнению с группой с однократной виротерапией неиммунизированных мышей (медиана 30 дней) выживаемость при трехкратном введении вируса и вовсе была ниже (Рисунок 45). Следует отметить, что после введения третьей дозы у животных развился выраженный отёк в области сформировавшейся опухоли, который существенно затруднял точные измерения новообразования (Рисунок 46). Возможно, что именно сформировавшийся отек, а не рост самой опухоли, приводил к раннему выводу из эксперимента мышей, что требует оптимизации интервалов введения вируса. 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 норму.

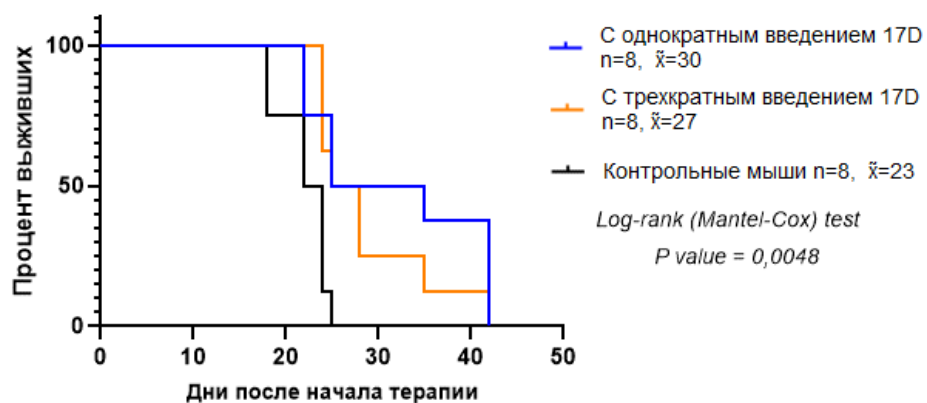


Рисунок 45 - Анализ выживаемости Каплана-Майера неиммунизированных мышей с тройной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. Полученные данные были статистически оценены методом Мантела-Кокса

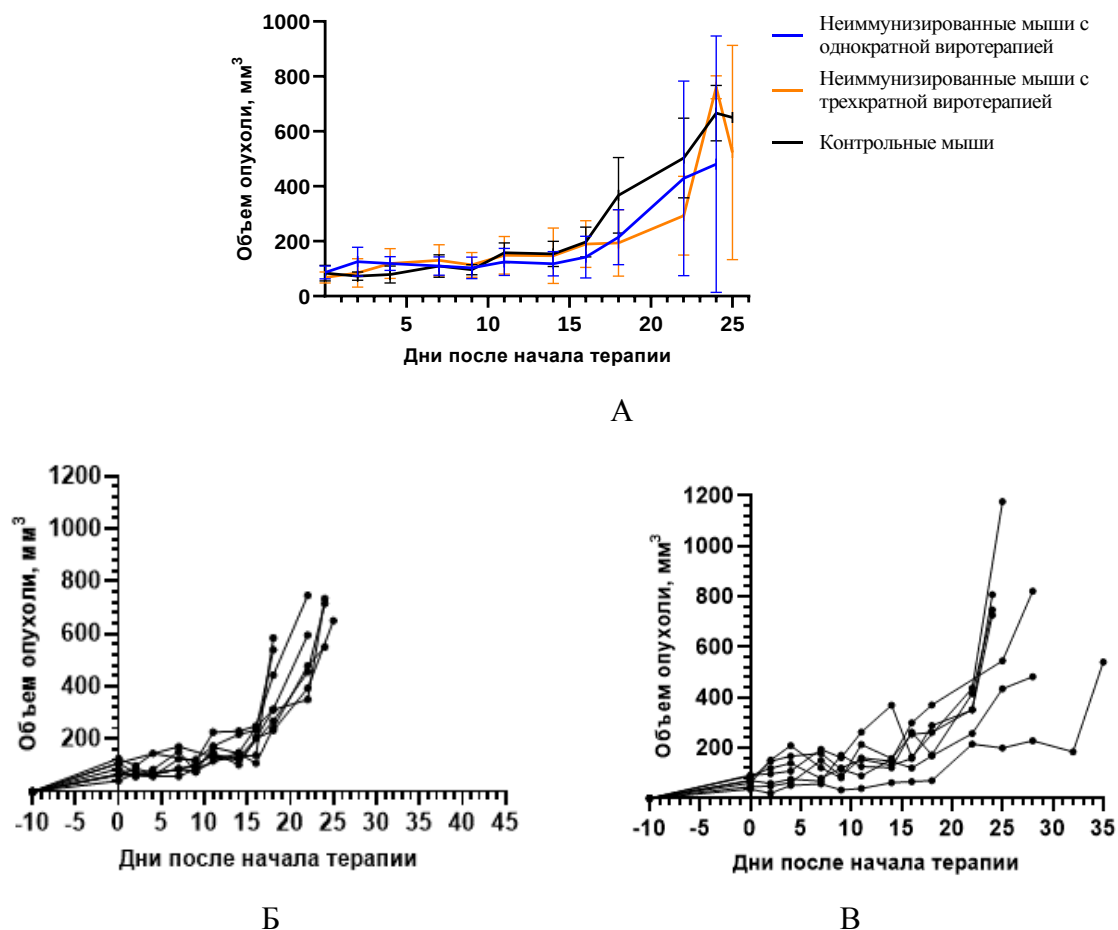


Рисунок 46 - Графики роста опухолей в зависимости от времени эксперимента в опыте с трехкратной виротерапией неиммунизированных мышей. (А) Общий график роста опухолей у контрольных мышей и неиммунизированных мышей с однократной и трехкратной виротерапией ВЖЛ, (Б) График увеличения объема опухолей в контрольной группе мышей (n=8). (В) График увеличения объема опухолей в группе неиммунизированных мышей с трехкратной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ (n=8)

Исследование влияния многократной виротерапии на иммунизированных мышах показало более обнадеживающие результаты по сравнению с неиммунизированной группой. Выживаемость была на 43% выше (медиана выживаемости составила 33 дня) по сравнению с контрольной группой (медиана выживаемости составила 23 дня). Примечательно, что одна мышь прожила 49 дней, что превысило медиану выживаемости в группе иммунизированных мышей с однократной виротерапией (Рисунок 47). Однако все равно общий терапевтический эффект многократного введения вируса оказался менее выраженным, чем при однократной виротерапии иммунизированных мышей, где медиана выживаемости составила 36 дней (Рисунок 47) и замедление роста новообразования было более значительным (Рисунок 48А). Как и в случае с

неиммунизированными мышами с многократной виротерапией мы наблюдали токсические эффекты сразу после введения третьей дозы, которые исчезали в течение суток и мыши восстанавливались до нормального состояния. Также в последующем у экспериментальных мышей развивался отек в месте инъекции, который затруднял четкие измерения опухоли и потенциально мог стать причиной преждевременного вывода животных из эксперимента (Рисунок 48). Как уже говорилось ранее, вероятно, оптимизация интервалов введения вируса обеспечит большую эффективность терапии. У всех мышей показатели периферической крови перед забоем были в пределах референсных значений, потери массы тела не наблюдалось.

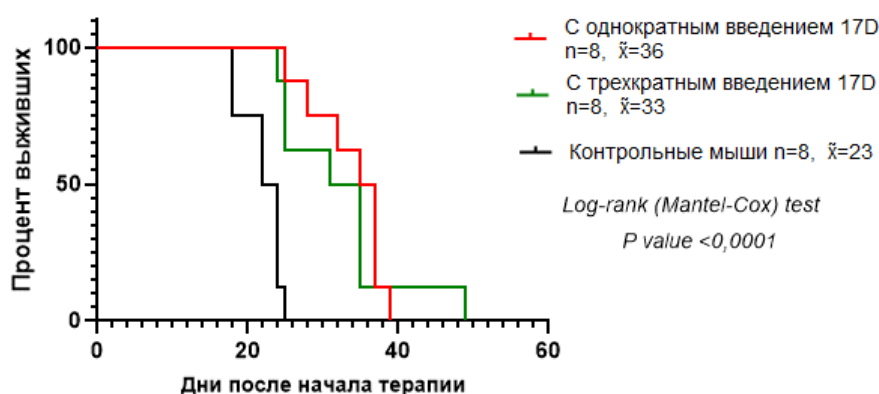


Рисунок 47 - Анализ выживаемости Каплана-Майера иммунизированных мышей с тройной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. Полученные данные были статистически оценены методом Мантела-Кокса

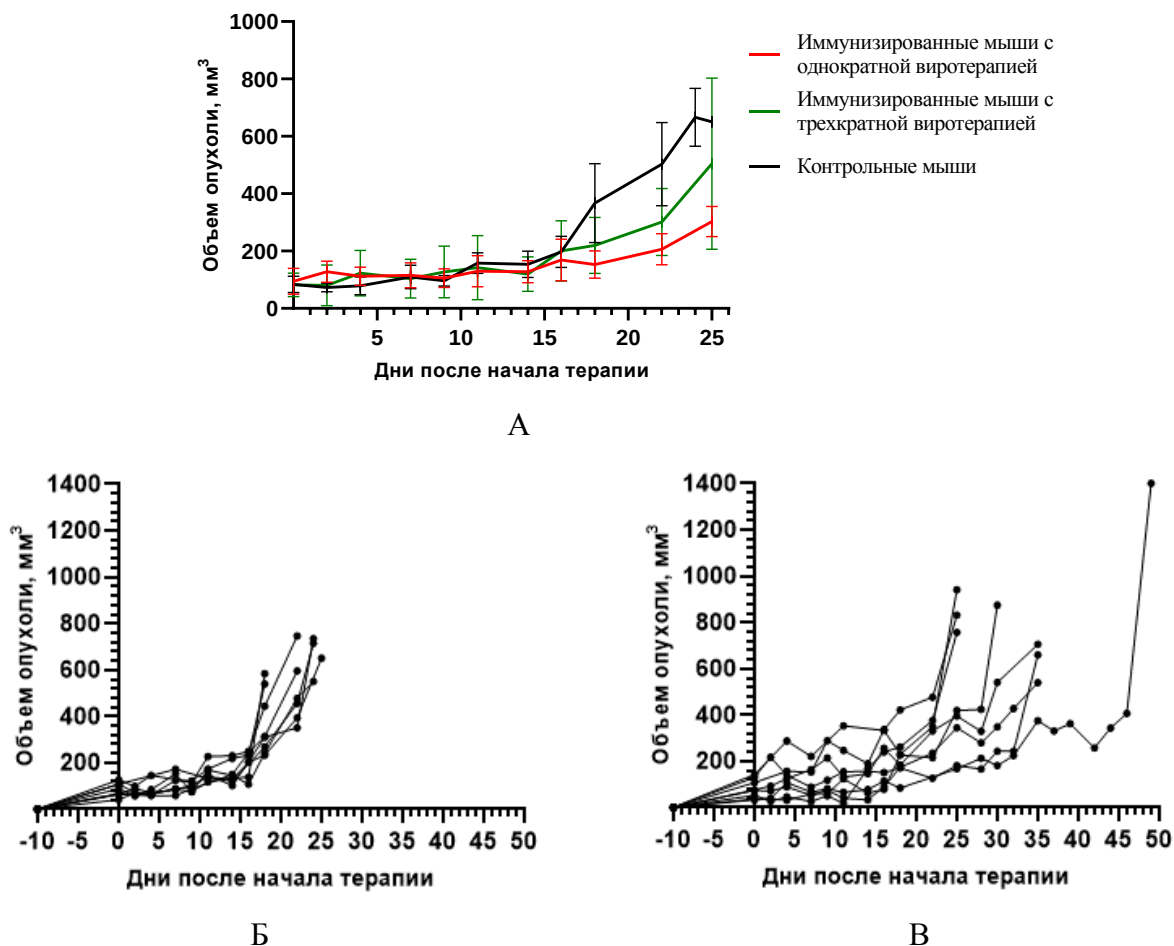


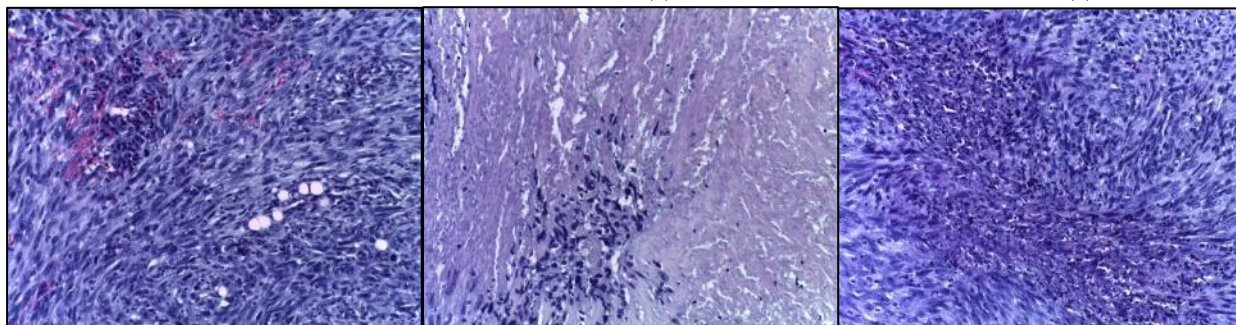
Рисунок 48 - Графики роста опухолей в зависимости от времени эксперимента в опыте с трехкратной виротерапией у иммунизированных мышей. (А) Общий график роста опухолей контрольных мышей и иммунизированных мышей с однократной и трехкратной виротерапией ВЖЛ, (Б) график увеличения объема опухолей в контрольной группе мышей (n=8). (В) График увеличения объема опухолей в группе иммунизированных мышей с трехкратной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ (n=8)

Гистологический анализ показал, что у неиммунизированных мышей с многократной виротерапией, подвергшимся эвтаназии на 25, 35 и 42 сутки эксперимента, в паратуморальной зоне опухоли присутствовала умеренная воспалительная клеточная (мононуклеарная) инфильтрация, опухоль содержала очаги некроза, патологические митозы и апоптоз атипичных клеток. Также опухоль была выраженного трабекулярно-фасцикулярного строения с «рыхлым» расположением атипичных клеток. В динамике (в сравнении с мышью, эвтаназированной на 24-е сутки эксперимента) отмечалось снижение клеточной плотности и митотической активности, повышение апоптотической гибели атипичных клеток (Рисунок 49А), а также деструкция кровеносных сосудов.

Лимфатические узлы мышей с виротерапией не отличались от контрольной группы.

В случае иммунизированных мышей с многократной терапией также были замечены изменения во фрагментах опухолей. У мыши, подвергшейся эвтаназии на 24 сутки эксперимента, паратуморальная зона опухоли содержала диффузную воспалительную клеточную инфильтрацию (преимущественно мононуклеарные клетки) и многоядерные клетки, паренхима аденокарциномы была псевдосolidного строения. В то время как у мыши, подвергшейся эвтаназии на 25 сутки, опухоль была частично трабекулярно-фасцикулярного строения, содержала очаги некроза и апоптоза атипичных клеток, а также диффузную слабую мононуклеарную инфильтрацию (Рисунок 49Б). В паратуморальной зоне опухоли присутствовала умеренная воспалительная клеточная инфильтрация. У мыши, подвергшейся эвтаназии на 35 сутки, опухоль была преимущественно трабекулярно-фасцикулярного строения, содержала «средние» очаги некроза и апоптоз атипичных клеток, а также диффузную слабую мононуклеарную инфильтрацию (Рисунок 49Б). В паратуморальной зоне опухоли также присутствовала умеренная воспалительная клеточная инфильтрация. Лимфатические узлы мышей не отличались от контрольной группы.

А

Мышь, выведенная на
24-й деньМышь, выведенная
на 25-й деньМышь, выведенная
на 35-й день

Б

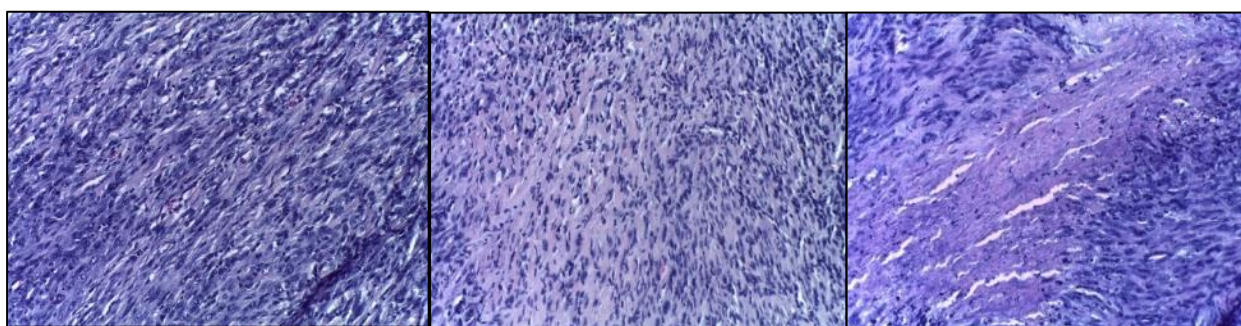


Рисунок 49 - Гистологическое исследование опухолей в группе неиммунизированных и иммунизированных мышей с трехкратной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. Окрашено гематоксилином и эозином; увеличение $\times 200$. (А) Фрагмент аденокарцином Pap02, полученный от неиммунизированных мышей, выведенных на 24, 25 и 35-й дни с тройной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ. (Б) Фрагмент аденокарцином Pap02, полученных от иммунизированных мышей, выведенных на 24, 25 и 35-й дни с тройной виротерапией штаммом 17D ВЖЛ

ПЦР-анализ фрагментов опухолей, собранных в конце исследования, не выявил наличия вирусной РНК ВЖЛ. Пять образцов опухолей и сывороток крови мышей, получавших вирус и прошедших эвтаназию на 32, 36, 38 и 49-й дни, были проанализированы и дали отрицательный результат на наличие вирусной РНК. Кроме того, дополнительно было проведено тестирование образцов опухолей на наличие живого вируса. При контакте опухолевого экссудата с клетками Vero инфекционный вирус не был обнаружен. Это может указывать на быстрое выведение штамма 17D ВЖЛ после инъекции.

Подводя итоги проведённых исследований, можно отметить противоречивость полученных результатов при проведении тройной виротерапии штаммом 17D ВЖЛ. С одной стороны, наблюдались явные негативные последствия в результате многократной терапии в виде токсических эффектов,

которые, хотя и проходили через сутки, всё же свидетельствовали о повышенной нагрузке на организм животных. Помимо этого, медиана выживаемости после тройной виротерапии оказалась ниже, чем при однократном введении штамма 17D ВЖЛ как неиммунизированным, так и иммунизированным мышам. С другой стороны, согласно гистологическому исследованию, иммунологический эффект многократной виротерапии был сильнее, чем при однократном введении вируса. В паратуморальной зоне опухоли наблюдалась умеренная инфильтрация иммунными клетками, а в самой опухоли развивался более интенсивный воспалительный процесс, появлялись обширные очаги некроза и апоптоза. Также следует отметить, что только в группе иммунизированных мышей с трехкратной виротерапией мононуклеарная инфильтрация наблюдалась в самой аденокарциноме, а не только в паратуморальной зоне, хотя она и была слабая. Возможно, что именно перитуморальный отёк, развивающийся за счет инфильтрации иммунными клетками, а не рост опухоли, способствовал более раннему достижению мышами гуманной конечной точки, и, как следствие, уменьшению медианы выживаемости. В любом случае необходимы дополнительные эксперименты по оценке эффектов многократной терапии штаммом 17D ВЖЛ. Возможно, что увеличение интервалов для введения вируса уменьшит нежелательные эффекты.

3.3.4 Анализ количества нейтрализующих антител к вирусу желтой лихорадки и показателей крови мышей

Как было сказано ранее, анализ количества нейтрализующих антител показал наличие таковых во всех сыворотках иммунизированных мышей. Более детальное изучение динамики формирования антител к ВЖЛ выявило, что каждое последующее внутриопухолевое введение штамма 17D ВЖЛ вызывало повышение уровня нейтрализующих антител в сыворотке крови животных. В конечном итоге самый высокий титр антител к ВЖЛ в конце эксперимента был выявлен в группе с трехкратной виротерапией, при этом в контрольной группе (иммунизированные мыши без виротерапии) наблюдалась противоположная тенденция — уровень антител постепенно снижался (Таблица 4). Таким образом, мы увеличивали

резистентность к ВЖЛ с каждой последующей инъекцией. Одним из возможных решений данной проблемы могло бы стать увеличение дозы вводимого вируса. Это могло бы помочь преодолеть растущий барьер нейтрализующих антител и сохранить терапевтический эффект. Однако такой подход требует тщательного изучения, поскольку существует риск усиления токсических реакций, что необходимо учитывать при разработке оптимальных схем виротерапии.

Таблица 4 - Нейтрализующие антитела к ВЖЛ в сыворотке мышей через 14 дней после иммунизации ВЖЛ и в конце эксперимента. Титр антител оценивали с помощью реакции нейтрализации

Группа	Номер мышь	Нейтрализующие антитела после иммунизации, Ig	Нейтрализующие антитела после эксперимента, Ig
Иммунизированные мышь с однократной виротерапией ВЖЛ	1	2,8	3,4
	2	2,4	2,8
	3	2,9	>3,4
	4	2,4	>3,4
	5	2,4	3,4
	6	2,4	3,4
	7	2,4	3,4
	8	2,4	3,4
Иммунизированные мышь с трехкратной виротерапией ВЖЛ	1	3	>3,4
	2	3	>3,4
	3	2	3,1
	4	3,3	3,4
	5	3,4	>3,4
	6	2,9	>3,4
	7	3,4	>4,3
Иммунизированные мышь без виротерапии (контроль иммунизации)	1	2	1,5
	2	2	<2
	3	2	1,7
	4	2,1	<2
	5	2,1	2
	6	2,1	2
	7	2,1	2

В ходе виротерапии гематологические показатели (лейкоциты, лимфоциты, гранулоциты, гемоглобин, тромбоциты и др.) у мышей линии C57BL/6 контролировали в точках забора крови: 0 — интактные мыши (начало эксперимента); 1 — 14-й день после иммунизации; 2 — после имплантации опухолевых клеток Pan02 перед виротерапией штаммом 17D ВЖЛ; и 3 — гуманная конечная точка (конец эксперимента). Показатели общего анализа крови в каждой точке оставались в пределах референсных значений, мыши переносили все манипуляции и виротерапию до гуманной конечной точки. Однако мы обнаружили, что у иммунизированных мышей с однократной и трехкратной виротерапией количество лейкоцитов к концу эксперимента заметно снижалось в отличие от мышей без виротерапии (с опухолью PAN02 и без опухоли), у которых значения лейкоцитов практически не изменялись (Рисунок 50А). При этом у неиммунизированных мышей похожая тенденция наблюдалась лишь в группе с трехкратной виротерапией, в то время как колебания лейкоцитов у мышей с однократной виротерапией не были статистически значимыми, как и в случае контрольной группы (с опухолью PAN02 и без опухоли) (Рисунок 50Б). Среди лейкоцитов преобладали лимфоциты - 80,92%.

В итоге можно предположить, что незначительное снижение лейкоцитов в периферической крови, наблюдаемое после проведения виротерапии, связано с их активной миграцией из кровяного русла непосредственно в опухоль. Данная гипотеза согласуется с результатами гистологического исследования, которое показало, что у иммунизированных мышей с однократной и многократной виротерапией, а также у неиммунизированных мышей с многократной виротерапией была обнаружена инфильтрация паратуморальной зоны опухоли иммунными клетками.

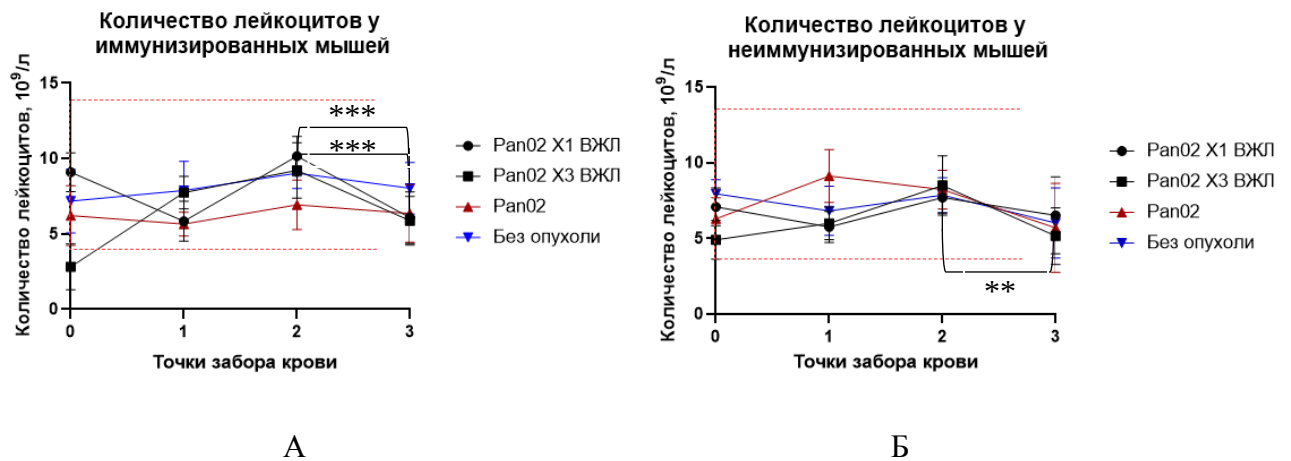


Рисунок 50 - Количество лейкоцитов у мышей (А) иммунизированных и (Б) неиммунизированных. Точки забора крови: 0 — интактные мыши (начало эксперимента); 1 — 14-й день после иммунизации; 2 — после имплантации опухолевых клеток Pan02, до виротерапии; 3 — гуманная конечная точка (окончание эксперимента). Красные пунктирные линии - референсные значения для мышей C57BL/6. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA

Наши исследования показывают, что штамм 17D ВЖЛ способен замедлять рост PDAC Pan02 предположительно иммуноопосредованным образом. Мы сделали такой вывод поскольку ВЖЛ вызывал замедление роста опухоли и увеличение медианы выживаемости у мышей с опухолями Pan02, при этом эффект от терапии был более выражен в группе иммунизированных мышей. Помимо этого, при однократной виротерапии ВЖЛ по результатам гистологического анализа мы наблюдали мононуклеарную инфильтрацию в паратуморальной зоне и крупные очаги гибели клеток только у иммунизированных мышей, в то время как в группе неиммунизированных мышей наблюдалась активная клеточная пролиферация и отсутствие инфильтрации иммунными клетками. Поскольку по результатам *in vitro* 17D ВЖЛ способен вызывать лишь временное ингибирование роста клеток Pan02, мы предполагаем, что слабая задержка роста опухоли у неиммунизированных мышей с однократным введением вируса связана с непосредственным действием вируса на опухоль, и после элиминации вируса опухолевые клетки продолжают активно делиться. В случае предварительной иммунизации с последующим однократным введением ВЖЛ активируется противовирусный иммунный ответ, что способствует активации как врожденного, так и адаптивного иммунитета против опухолей. Однако для однозначного подтверждения нашей гипотезы

требуются дополнительные эксперименты с изучением профиля иммунных клеток, которые инфильтрируют опухоль, а также оценка цитокинового профиля.

Несмотря на то, что эксперименты с многократным введением вируса дали неоднозначные результаты, мы считаем этот подход перспективным, поскольку только в группе иммунизированных мышей с многократной виротерапией мы наблюдали инфильтрацию иммунными клетками не только паратуморальной зоны, но и самой аденокарциномы. Дальнейшая оптимизация методики может включать постепенное увеличение дозы ВЖЛ и интервалов между введениями вируса. Такой подход способен снизить формирование резистентности к ВЖЛ и минимизировать токсические эффекты, что в конечном итоге может привести к повышению выживаемости. Результаты исследований, представленные в разделах 3.2 и 3.3, опубликованы в работе [174].

Таким образом, учитывая способность ВЖЛ (штамм 17D) лизировать клеточные линии PDAC человека (раздел 3.1.5. и 3.2), мы предполагаем, что синергия противоопухолевого иммунного ответа и прямое онколитическое действие вируса лишь усилит эффекты терапии ВЖЛ в случае опухолей человека. Поэтому, мы считаем перспективным дальнейшее изучение механизмов онколиза 17D ВЖЛ *in vitro* и *in vivo* в отношении PDAC.

3.4 Оценка действия комбинированной терапии вируса везикулярного стоматита с протопорфирином IX на глиобластома человека

Наряду с PDAC, в поиске эффективных методов лечения нуждается глиобластома — агрессивная форма опухоли головного мозга с низкой выживаемостью пациентов. ВВС продемонстрировал большой потенциал для лечения данной нозологии [176], в том числе, и в наших исследованиях (раздел 3.1.1). Однако, в терапии ВВС существуют свои ограничения, которые препятствуют его эффективному применению. Эти ограничения включают высокую чувствительность ВВС к интерферону, сложность проникновения вируса вглубь солидных опухолей, а также быстрая элиминация из организма. В таком

случае сочетание онколитической вирусной терапии с ФДТ может решить часть проблем монотерапии одним из методов и повысить противоопухолевый эффект. Метод ФДТ основан на селективном накоплении в опухолевой ткани ФС, способного при фотовозбуждении взаимодействовать с молекулами кислорода, переводя их в крайне активное синглетное состояние, в котором эти молекулы вызывают повреждение опухолевых клеток. ФДТ успешно применяется в клинической онкологии для лечения опухолей кожи, а также является перспективным вариантом лечения глиобластомы [210]. В случае комбинированного использования ФДТ и ОВ помимо прямого действия на опухоль, ФДТ может воздействовать на сосудистую сеть опухоли, нарушая её кровоснабжение и увеличивая проницаемость сосудистых стенок, что облегчает проникновение ОВ, создавая тем самым возможности для синергетического действия. Данный подход уже применялся ранее и показал свою эффективность на модели *in vivo* [16]. В рамках исследования мы провели изучение комбинированного действия ВВС и ФДТ с использованием в качестве фотосенсибилизатора протопорфирина IX, который нам предоставили наши коллеги из ФГБУН Института физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина РАН в рамках соглашения о научном сотрудничестве № 55 от 14.11.2022. Для проведения экспериментов мы выбрали две хорошо охарактеризованные линии клеток глиобластомы человека различного происхождения: фибробластов T98G и эпителиальных клеток LN-229.

3.4.1 Оценка цитотоксического действия протопорфирина IX на клеточные линии глиобластомы человека

Изначально мы провели оценку темновой токсичности и фототоксичности протопорфирина IX *in vitro* с использованием МТТ-теста. В ходе эксперимента протопорфирин IX растворяли в ДМСО с PBS, где концентрация ДМСО не превышала 10%. Затем клетки инкубировали с раствором в течение часа, при этом контрольные клетки инкубировали с 10%-ным ДМСО в PBS, чтобы исключить влияние самого растворителя на результаты. Далее клетки облучали

(фототоксичность) или не облучали (темновая токсичность) светом длиной волны 450 нм и через сутки оценивали их жизнеспособность.

Результаты показали, что протопорфирин IX проявлял темновую токсичность, выраженную в 50%-ной клеточной гибели (IC_{50}), в концентрации 48 ± 7 мкг/мл для культуры T98G и 40 ± 6 мкг/мл для клеточной линии LN-229 (Рисунок 51А). Обработка протопорфирином IX с последующим облучением светом оказывала цитотоксическое действие на исследуемые клеточные линии дозозависимым образом, при этом IC_{50} наблюдалась при концентрации 5 ± 1 мкг/мл для T98G и около 3 ± 1 мкг/мл для LN-229 (Рисунок 51Б).

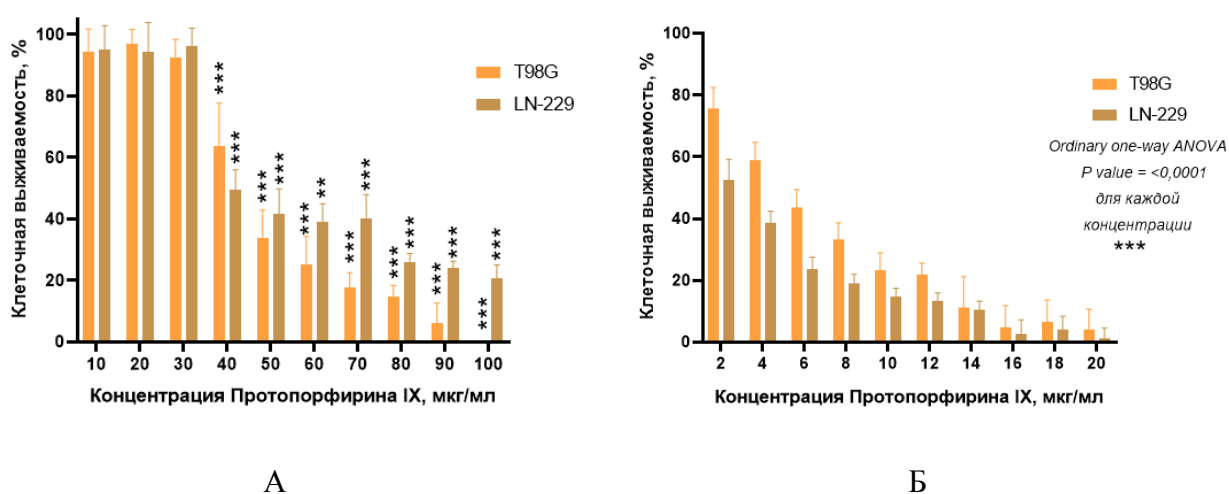


Рисунок 51 - Чувствительность клеточных линий глиобластомы человека T98G и LN-229 к протопорфирину IX по результатам МТТ-теста. (А) Темновая цитотоксичность протопорфирина IX. (Б) Фототоксичность протопорфирина IX. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Оценку действия фотосенсибилизатора производили в сравнении с клетками без воздействия протопорфирина IX (на графиках не представлено)

3.4.2 Получение комплекса протопорфирина IX с вирусом везикулярного стоматита и оценка его онколитического действия

Среди одной из проблем ФДТ является вопрос селективного накопления ФС в опухолевых клетках. Для облегчения доставки протопорфирина IX, а также для сочетания фотодинамической и вирусной терапии мы получили комплекс протопорфирина IX с ВВС.

Способность ВВС образовывать комплексы с малыми молекулами без потери своей инфекционности была проверена с помощью взаимодействия ВВС с

флуоресцентным красителем Cyanine5.5. Очищенный ВВС в титре $4 \cdot 10^9$ ЦПД₅₀/мл смешивали с раствором активированного производного Cyanine5.5 в виде его N-сукцинимидного эфира (Рисунок 52), после чего проводили очистку полученного комплекса ВВС-Cyanine5.5 от непрореагировавшего красителя. На следующем этапе получали комплекс ВВС-протопорфирин IX, используя аналогичный метод, что и для получения комплекса с Cyanine5.5, за исключением того, что титр вводимого ВВС в реакцию составлял 10^8 ЦПД₅₀/мл (Рисунок 53).

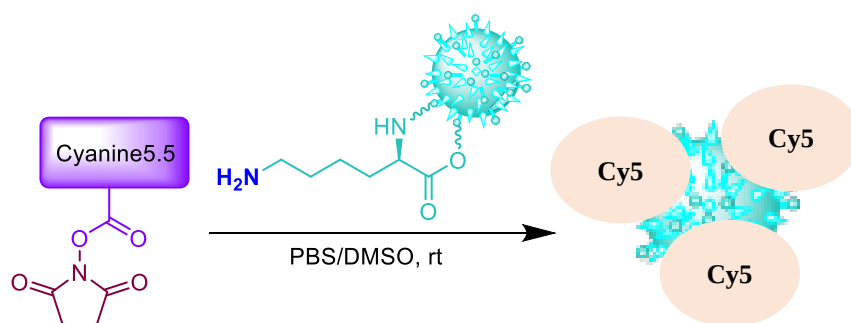


Рисунок 52 - Комплекс ВВС-Cyanine5.5

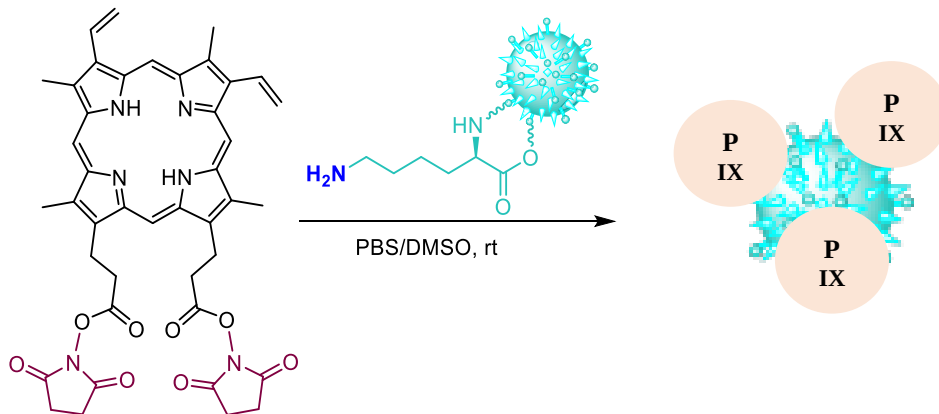


Рисунок 53 – Комплекс ВВС-протопорфирин IX

После проведения взаимодействия мы оценили эффективность формирования комплекса, степень его чистоты, а также инфекционность вируса, в который были включены малые молекулы. Для подтверждения включения Cyanine5.5 в ВВС мы оценивали флуоресценцию полученного комплекса. Спектр флуоресценции комплекса ВВС-Cyanine5.5 в буфере PBS полностью соответствовал спектру флуоресценции чистого красителя Cyanine5.5 с

максимумом при длине волны 704 нм и плечом при 752 нм (Рисунок 54А), в то время как спектр флуоресценции комплекса ВВС-протопорфирин IX в PBS был подобен спектру чистого порфирина, но наблюдался батохромный сдвиг на 14 нм, что связано с образованием связи между протопорфирином IX и ВВС или встраиванием протопорфирина IX в мембрану ВВС (Рисунок 54Б).

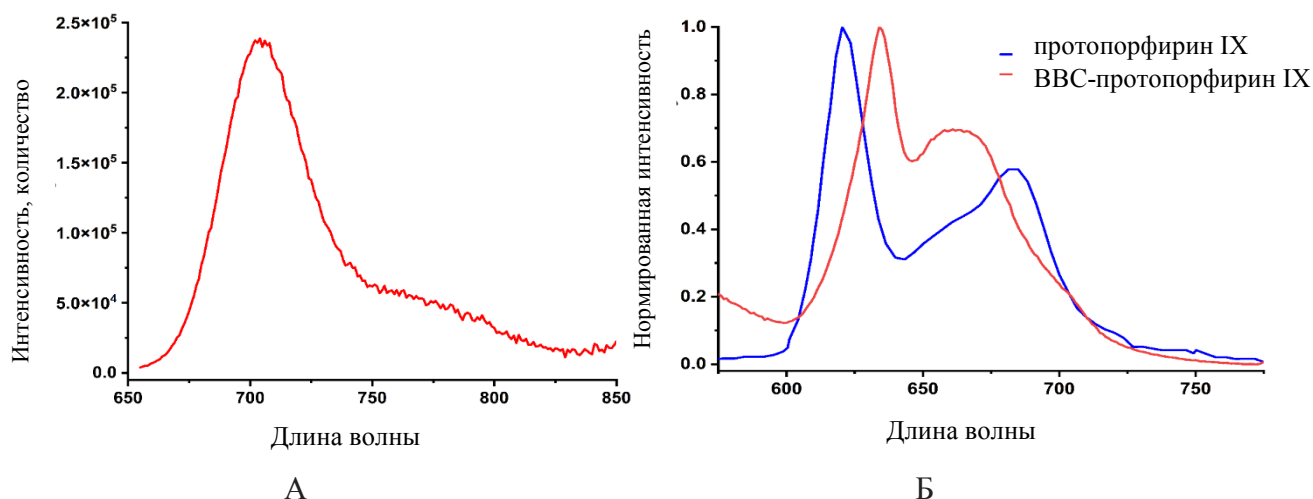
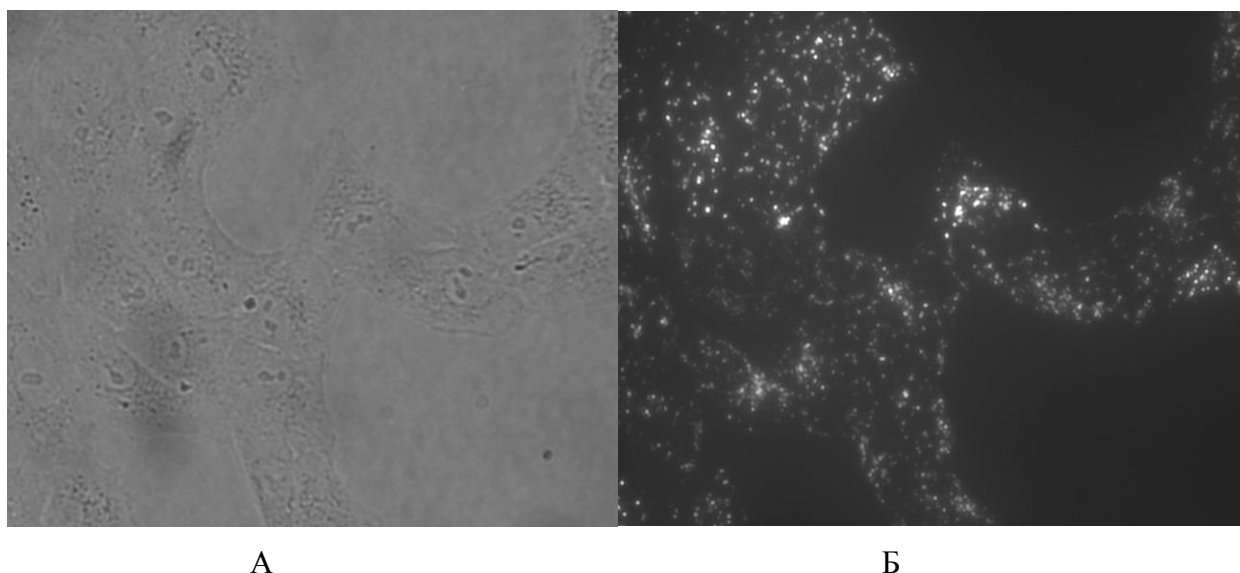


Рисунок 54 - Спектры флуоресценции (А) комплекса ВВС-Сyanine5.5 (возбуждение при 635 нм), (Б) комплекса ВВС-протопорфирин IX (возбуждение при 405 нм) (красная линия) и протопорфирина IX (синяя линия). Измерено в буфере PBS

Для оценки степени чистоты и инфекционности полученных комплексов мы провели эксперимент с инфицированием клеточной линии Vero при плотности монослоя около 40%. Через час инкубации комплексов с клетками была проведена оценка наличия флуоресцентного сигнала, продуцируемого комплексами. Мы наблюдали адсорбцию ВВС-Сyanine5.5 на поверхности клеток (Рисунок 55) и перемещение вирусных капсидов по цитоскелету. В качестве отрицательного контроля мы использовали метку Сyanine5.5, которая прошла те же этапы очистки, что и комплекс ВВС-Сyanine5.5. Конечный раствор также инкубировали с клетками Vero и через час мы не наблюдали флуоресцентного сигнала. В другом эксперименте при заражении комплексом клеточной линии Vero через два дня мы обнаружили ЦПД, характерное для ВВС. Эти эксперименты подтвердили включение Сyanine5.5 в ВВС и сохранение инфекционности комплекса. Однако следует отметить, что титр вируса после всех манипуляций снизился на 5 порядков и составил 10^4 ЦПД₅₀/мл, хотя изначально был 4×10^9 ЦПД₅₀/мл.

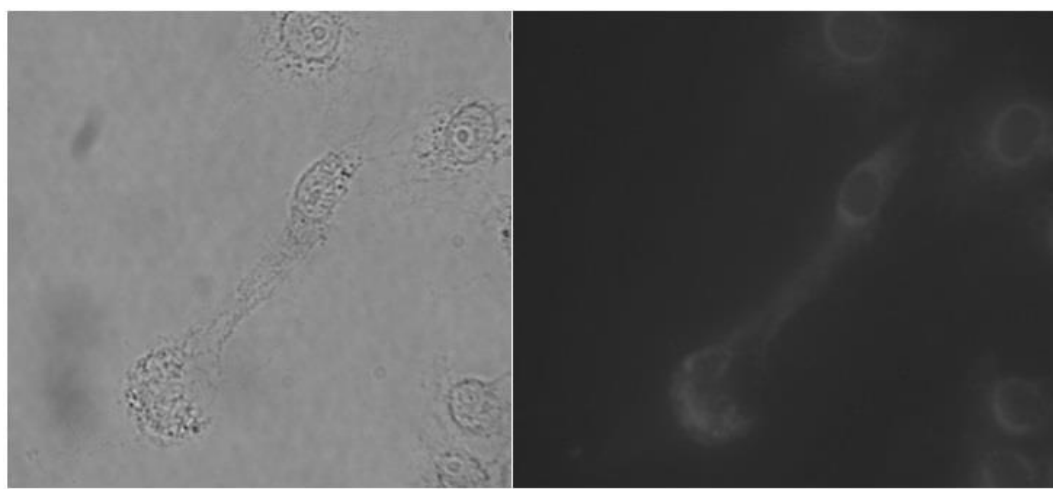


А

Б

Рисунок 55 – Комплекс ВВС-Суanine5.5 после часа инкубации с клеточной линией Vero. (А) При полном спектре света. (Б) На канале Су5. Изображения получены с 40-кратным увеличением с помощью системы визуализации Celena X

Комплекс ВВС-протопорфирин IX также оставался инфекционным, что подтверждалось наличием характерного для ВВС ЦПД на следующий день после заражения клеточной линии Vero. В другом эксперименте мы обнаружили адсорбцию комплекса ВВС-протопорфирин IX на поверхности клеток Vero, о чем свидетельствовал флуоресцентный сигнал по границам клеток, однако, комплекс оказывал токсическое действие на клетки, и уже через час после заражения клетки округлялись, что видно на рисунке 56. Такой эффект, вероятно, оказывал протопорфирин IX в составе комплекса, который был активирован светом от флуоресцентного микроскопа. Помимо этого, титрование комплекса ВВС-протопорфирин IX показало 8-кратное снижение титра вируса, что, вероятно, связано с повреждением мембраны ВВС из-за встраивания в нее протопорфирина IX [211; 212].

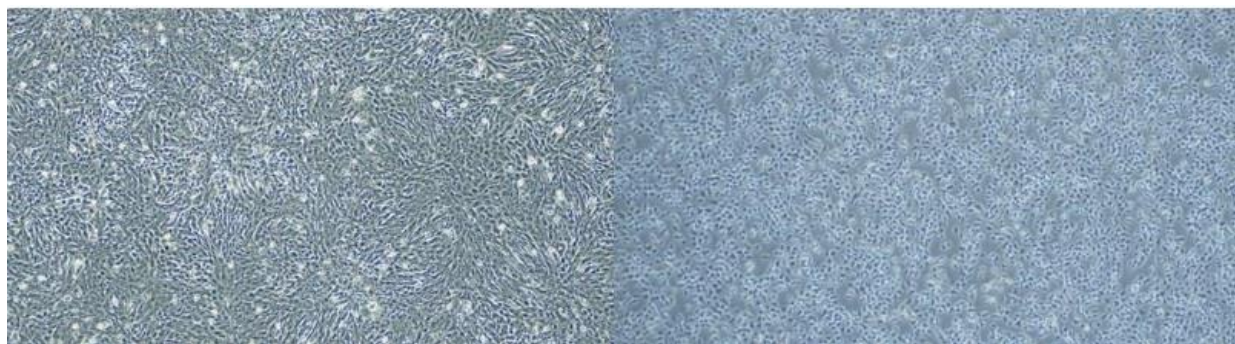


А

Б

Рисунок 56 - Комплекс ВВС-протопорфирин IX через час инкубации с клеточной линией Vero. (А) При полном спектре света. (Б) На канале Cy5. Изображения получены с 200-кратным увеличением с помощью системы визуализации Celena X

Фототоксические свойства полученного комплекса ВВС-протопорфирин IX были исследованы на клеточной линии глиобластомы T98G. Монослой клеток T98G инфицировали ВВС-протопорфирин IX, а затем облучали светом с длиной волны 450-480 нм. На следующий день наблюдалось разрушение монослоя, оцениваемое в 1-2 креста (Рисунок 57), при этом полной гибели клеток не наблюдалось даже через 3-е суток. Слабый эффект от терапии вероятно связан с действием протопорфирина IX на вирус (инактивация путем встраивания в мембрану вируса, а также 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.



А

Б

Рисунок 57 - Эффект от воздействия комплекса ВВС-протопорфирин IX на глиобластому T98G.

(А) Неинфицированная культура Т98G. (Б) Инфицированная ВВС-протопорфирин IX культура Т98G. Световая микроскопия при 4-х кратном увеличении

Таким образом, стратегия создания комплекса вируса с протопорфирином IX не является эффективной. Хотя нам удалось создать функциональные комплексы и наблюдать определенные изменения в клеточных культурах, эффективность их применения была низкая. Из-за инактивирующего действия протопорфирина IX на ВВС и его низкой концентрации в составе комплекса оказалось сложно достичь выраженного терапевтического эффекта на глиобластомах Т98G. Исходя из этого, возможно, для успешной комбинированной терапии ФДТ с онколитическим ВВС требуется последовательное введение ФС и вируса.

3.4.3 Оценка действия комбинированной терапии вируса везикулярного стоматита с протопорфирином IX на клеточные линии глиобластомы человека

Мы изучили последовательное действие ФДТ и ВВС на клеточных линиях Т98G и LN-229 методом МТТ-теста. Изначально клетки 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 ЦПД₅₀/мл) сразу после облучения или через сутки, и через три дня оценивали жизнеспособность клеток. В результате эксперимента при введении вируса с MOI = 0,001 сразу после активации ФС средняя выживаемость клеток Т98G варьировалась от 21 до $35 \pm 10\%$ в зависимости от концентрации протопорфирина IX, что было сопоставимо с выживаемостью культуры Т98G ($29 \pm 8\%$) при действии на нее одного лишь ВВС (Рисунок 58). Однако, при введении вируса через сутки после активации протопорфирина IX клеточная выживаемость составила $2 - 10 \pm 2\%$ при тех же концентрациях ФС, что значительно ниже, чем действие вируса или протопорфирина IX в качестве моноагента (Рисунок 58). При действии ВВС с MOI = 0,0001 тенденция сохранялась: при добавлении вируса сразу после активации ФС выживаемость культуры Т98G варьировалась от 28 до $65 \pm 5\%$ в зависимости от

концентрации протопорфирина IX, в то время как онколитическое действие только ВВС было даже эффективнее комбинированной терапии при низких концентрациях протопорфирина IX (выживаемость культуры T98G составила $46 \pm 20\%$). При добавлении вируса через сутки после активации ФС эффект был более выражен - выживаемость клеток T98G составила $13 - 18 \pm 3\%$ (Рисунок 59).

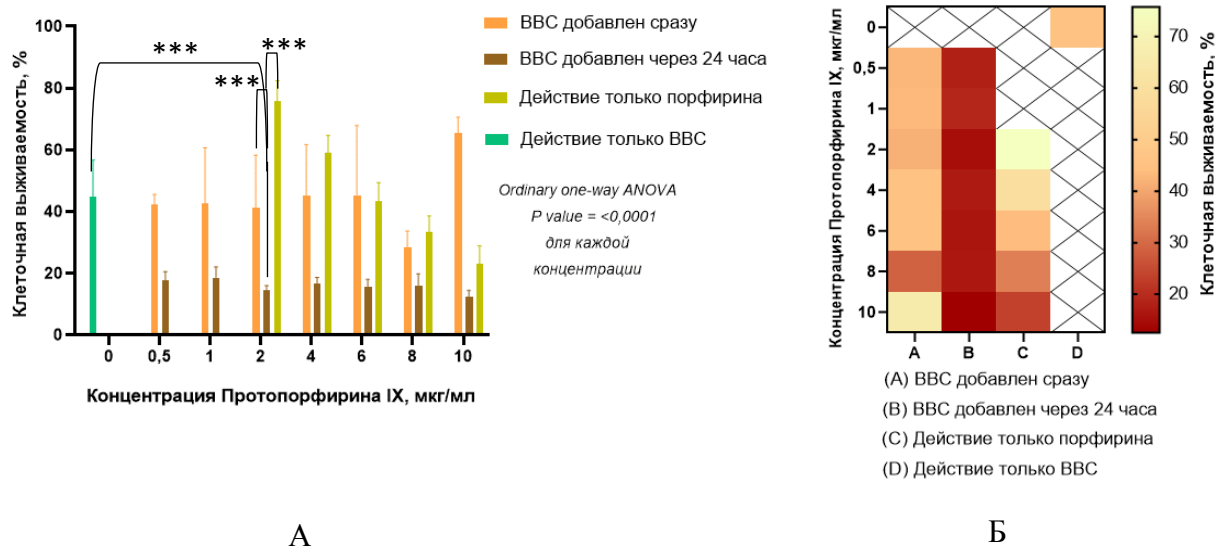


Рисунок 58 - Выживаемость клеточной линии глиобластомы T98G в результате комбинированной терапии ФС и ВВС при MOI = 0,001. (А) Общий график. (Б) Тепловая карта. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Статистические различия между монотерапией протопорфирином IX или ВВС в сравнении с комбинированной терапией с добавлением ВВС через 24 часа наблюдали для всех концентраций протопорфирина IX

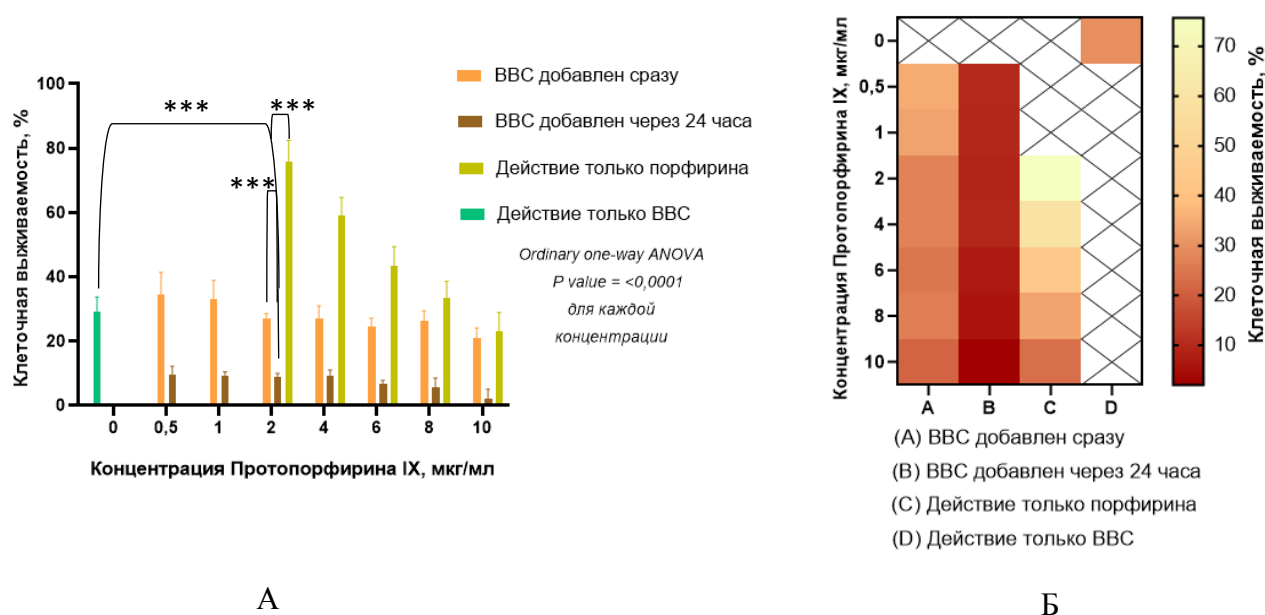


Рисунок 59 - Выживаемость клеточной линии глиобластомы T98G в результате комбинированной терапии ФС и ВВС при MOI = 0,0001. (А) Общий график. (Б) Тепловая карта.

Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Статистические различия между монотерапией протопорфирином IX или BBC в сравнении с комбинированной терапией с добавлением BBC через 24 часа наблюдали для всех концентраций протопорфирина IX

Аналогичный эксперимент на культуре LN-229 продемонстрировал схожие результаты с экспериментом на культуре T98G, однако эффект комбинированной терапии проявился в меньшей степени. При добавлении BBC через сутки после ФС с $MOI = 0,0001$ наблюдали усиление действия комбинированной терапии, где выживаемость культуры LN-229 варьировалась от 15 до $7 \pm 7\%$, в то время как при действии только BBC выживаемость клеток LN-229 составляла $47 \pm 11\%$ (Рисунок 60). Менее выраженный эффект комбинированной терапии наблюдали при добавлении BBC через сутки после ФС с $MOI = 0,001$. Лишь при концентрациях протопорфирина IX 8-10 мкг/мл установили статистически значимый эффект, выживаемость клеток LN-229 была снижена и составляла от 15 до $12 \pm 2\%$, в то время как при действии BBC в качестве моноагента выживаемость отмечалась на уровне $21 \pm 7\%$ (Рисунок 61). В обоих экспериментах при добавлении вируса сразу после ФС эффект от комбинированной терапии отсутствовал.

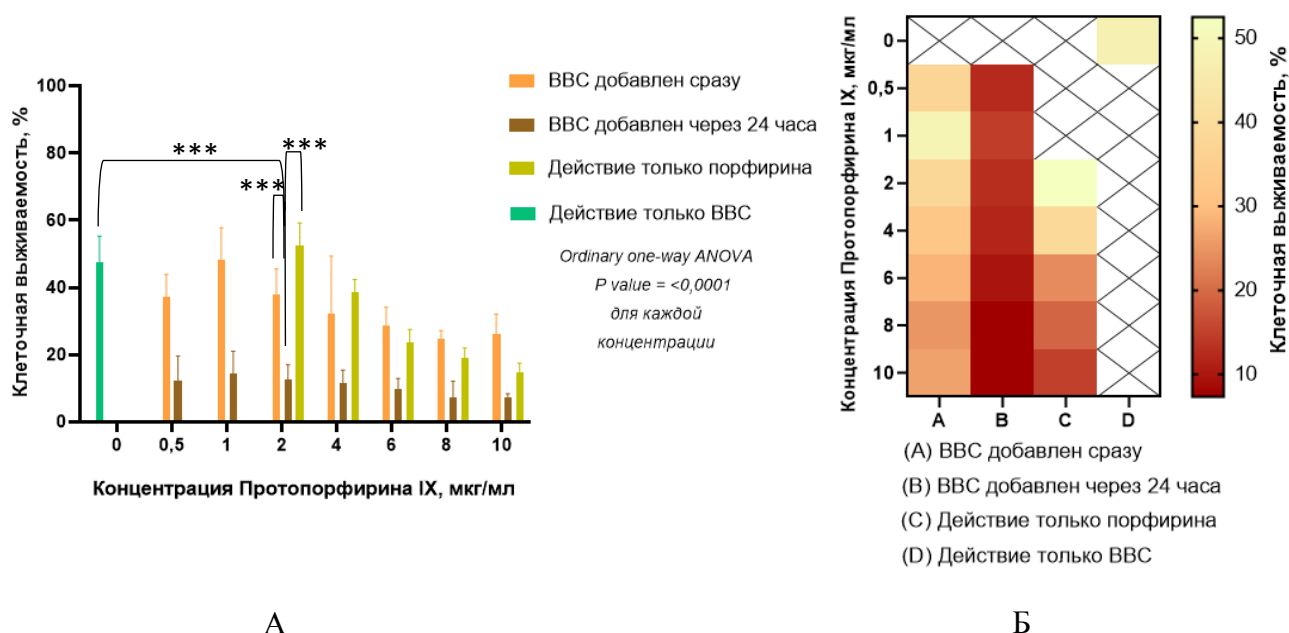


Рисунок 60 - Выживаемость клеточной линии глиобластомы LN-229 в результате комбинированной терапии ФС и BBC при $MOI = 0,0001$. (А) Общий график. (Б) Тепловая карта. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Статистические различия между монотерапией протопорфирином IX или BBC в сравнении с

комбинированной терапией с добавлением ВВС через 24 часа наблюдали для всех концентраций протопорфирина IX

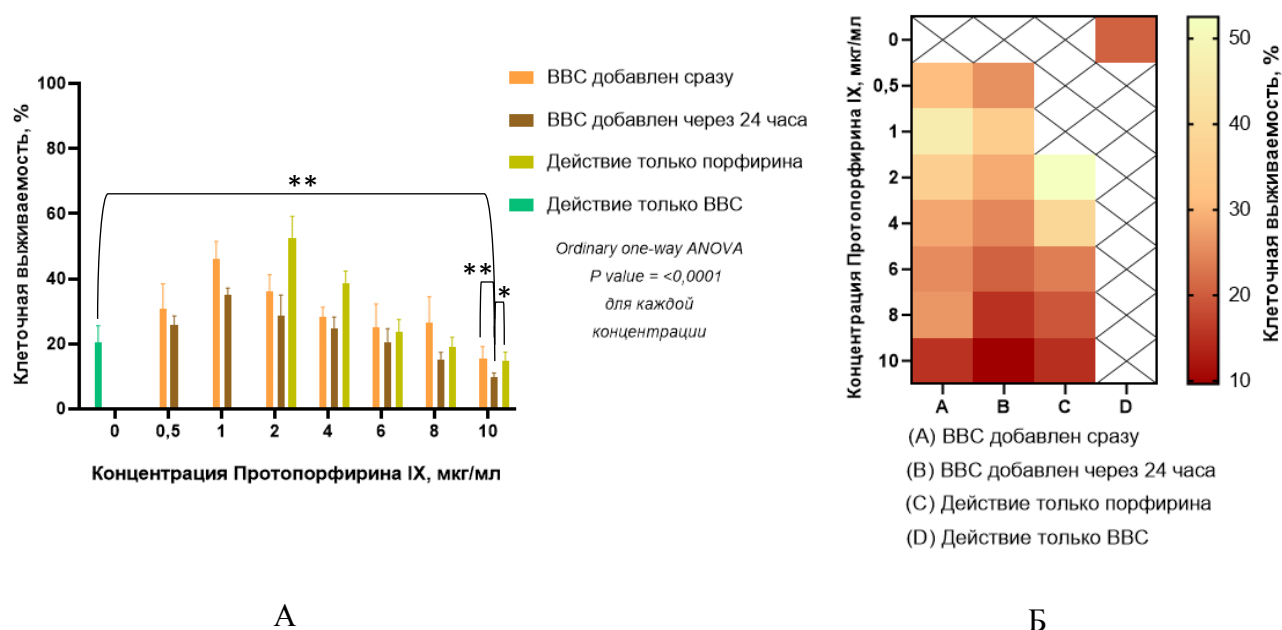


Рисунок 61 - Выживаемость клеточной линии глиобластомы LN-229 в результате комбинированной терапии ФС и ВВС при MOI = 0,001. (А) Общий график. (Б) Тепловая карта. Статистическая оценка была проведена с использованием анализа one-way ANOVA. Статистические различия между монотерапией протопорфирином IX или ВВС в сравнении с комбинированной терапией с добавлением ВВС через 24 часа обнаруживали при концентрациях протопорфирина IX 8-10 мкг/мл

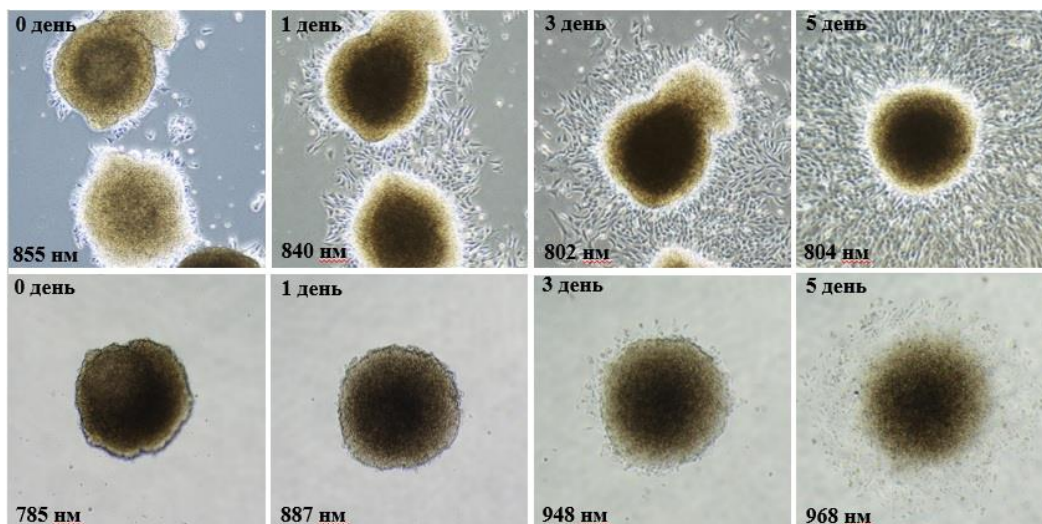
В итоге мы подтвердили, что комбинированная терапия с добавлением вируса через сутки после ФС усиливает противоопухолевые эффекты. Особенно интересным явился тот факт, что отсроченное введение вируса позволяет снизить токсическое воздействие АФК, генерируемых протопорфирином IX [213]. Механизм такого эффекта связан с динамикой образования и исчезновения АФК, где через сутки после активации ФС АФК практически отсутствуют в клетках. Поэтому введение вируса через сутки после ФС является хорошей стратегией для достижения максимального терапевтического эффекта.

3.4.4 Оценка действия комбинированной терапии вируса везикулярного стоматита с протопорфирином IX на 3D-сфероидах глиобластомы человека

Многоклеточные опухолевые сфероиды часто демонстрируют характеристики, сходные с характеристиками солидных опухолей *in vivo*, что делает их более интересной моделью для изучения противоопухолевых эффектов в сравнении с 2D культурами [214].

Изначально мы изучили эффекты монотерапии ВВС или ФС на опухолевые сфероиды T98G и LN-229. Сфероиды были инфицированы ВВС в титре 10^5 ЦПД₅₀/мл и наблюдались в течение 5 дней. К третьим суткам отмечалось выраженное ЦПД ВВС в виде разрыхления сфероидов T98G, потери их нативной структуры и малым количеством растущих клеток вокруг них (Рисунок 62Б). Напротив, в контрольной группе мы наблюдали постепенное разрастание клеток вокруг прикрепившегося тумороида (Рисунок 62А). К пятым суткам в инфицированных сфероидах мы обнаружили лизис выживших клеток и открепление сфероидов T98G, однако в некоторых случаях живые клетки все же обнаруживались (Рисунок 62Б).

А



Б

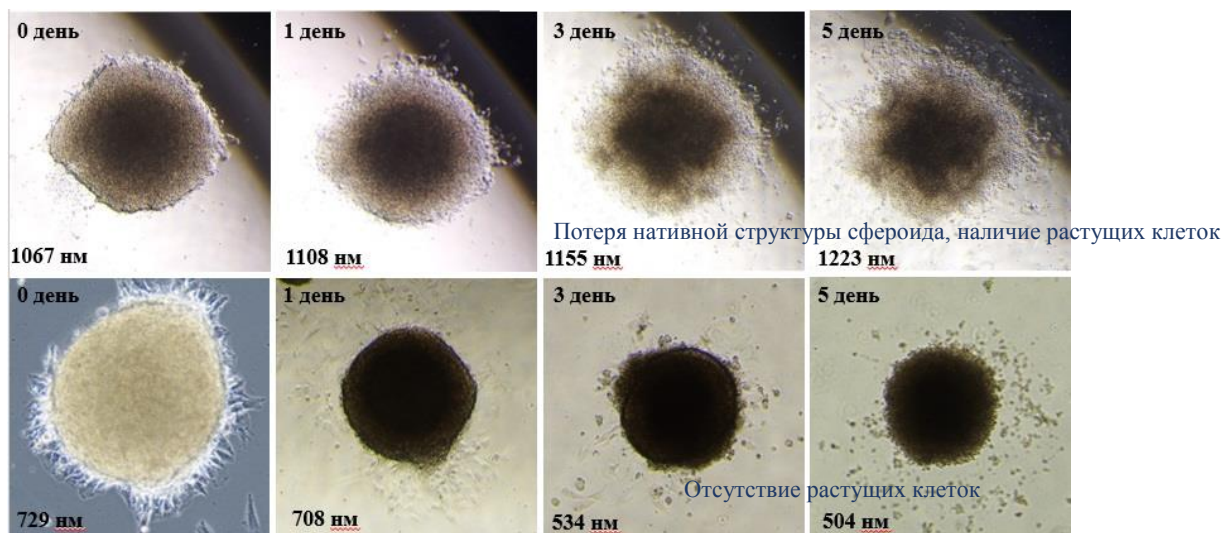


Рисунок 62 - Влияние ВВС на сфероиды Т98G. (А) Контрольные (неинфицированные) сфероиды. (Б) Сфероиды, инфицированные ВВС в титре 10^5 ЦПД₅₀/мл. Фотографии сфероидов сделаны с помощью светового микроскопа с 4-х кратным увеличением, в левом нижнем углу указаны размеры сфероидов

Аналогичный эффект был обнаружен на сфероидов LN-229. К третьему дню в контрольной группе мы наблюдали большую популяцию клеток вокруг тумароида (Рисунок 63А), в то время как зараженные сфероиды теряли первоначальную структуру, и популяция растущих клеток была небольшой. Эффекты усиливались к пятому дню, и сфероиды демонстрировали явные признаки цитопатического действия вируса - их структура становилась всё более рыхлой, а форма менее упорядоченной. Однако, полной гибели клеток при этом не происходило (Рисунок 63Б).

Итак, хотя ВВС действительно вызывает значительные патологические изменения в опухолевых сфероиде и заметно повреждает их структуру, полноценного лизиса опухолевых клеток вокруг тумороида не происходило.

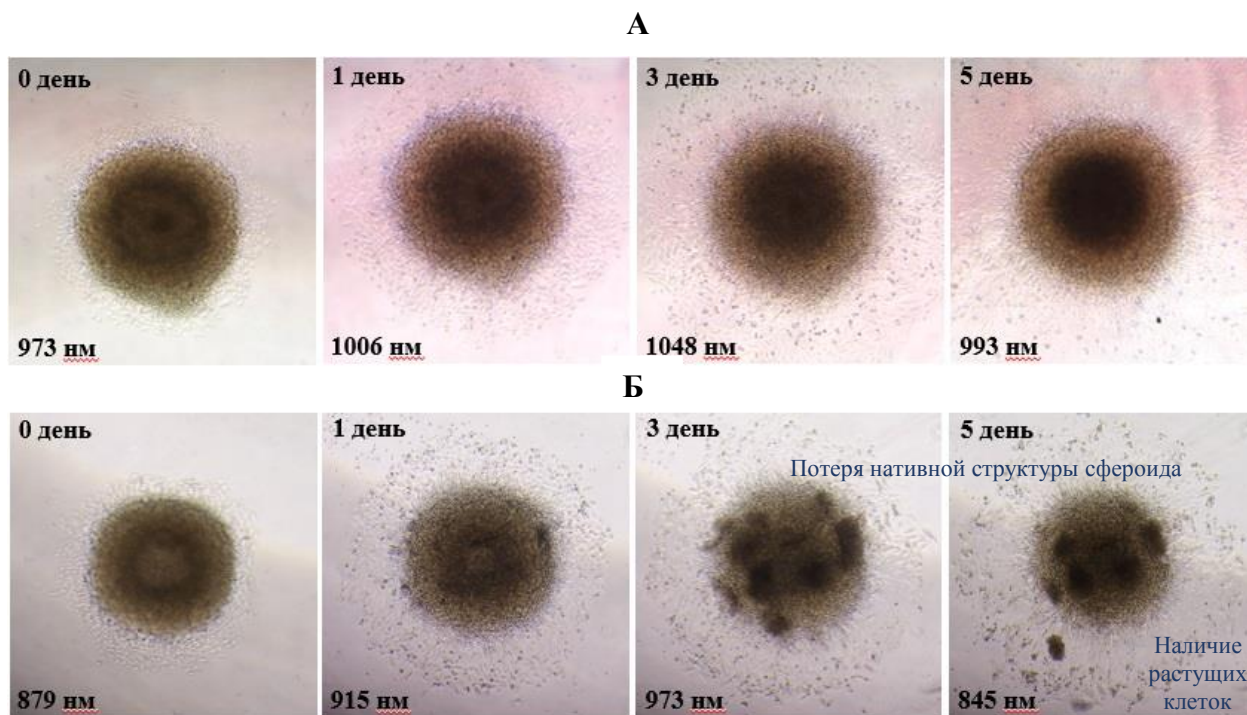
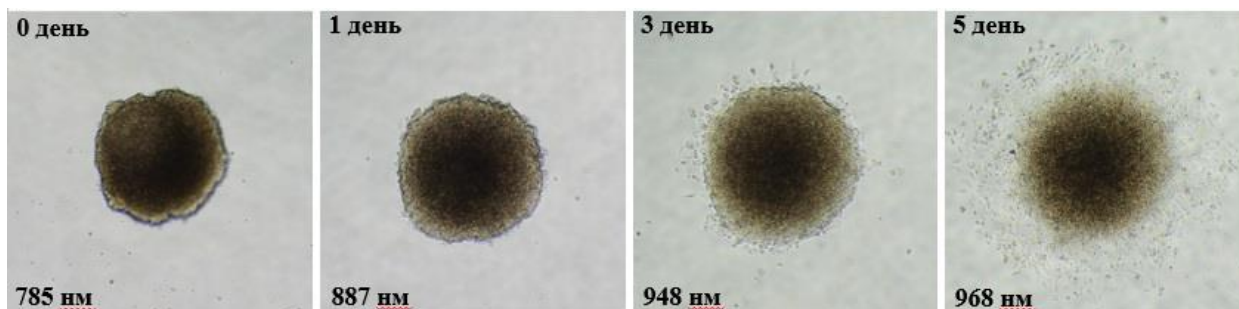


Рисунок 63 - Влияние ВВС на сфероиды LN-229. (А) Контрольные (неинфицированные) сфероиды. (Б) Сфероиды, инфицированные ВВС в титре 10^5 ЦПД₅₀/мл. Фотографии сфероидов сделаны с помощью светового микроскопа с 4-х кратным увеличением, в левом нижнем углу указаны размеры сфероидов

Далее мы исследовали влияние протопорфирина IX в качестве моноагента на сфероиды T98G и LN-229. Протопорфирин IX инкубировали со сфероидом в концентрации 10 мкг/мл в течение часа, после чего активировали ФС облучением длиной волны 450 нм. На двух сфероиде T98G мы не наблюдали цитотоксического действия протопорфирина IX, и клетки продолжали расти аналогично контрольной группе (Рисунок 64). Однако в шести других сфероиде T98G мы обнаружили цитотоксическое действие, которое отличалось от действия ВВС. У двух сфероидов наблюдалось поверхностное разрушение структуры, без глубоких изменений, а четыре других тумороида через сутки откреплялись от поверхности пластика и казались неживыми, но затем снова прикреплялись и, аналогично контролю, наступало разрастание клеточного слоя вокруг (Рисунок 64). Исходя из увиденного эффекта можно предположить, что протопорфирин IX

действует лишь на поверхность тумароида и не способен проникать между плотными контактами солидных новообразований.

А



Б

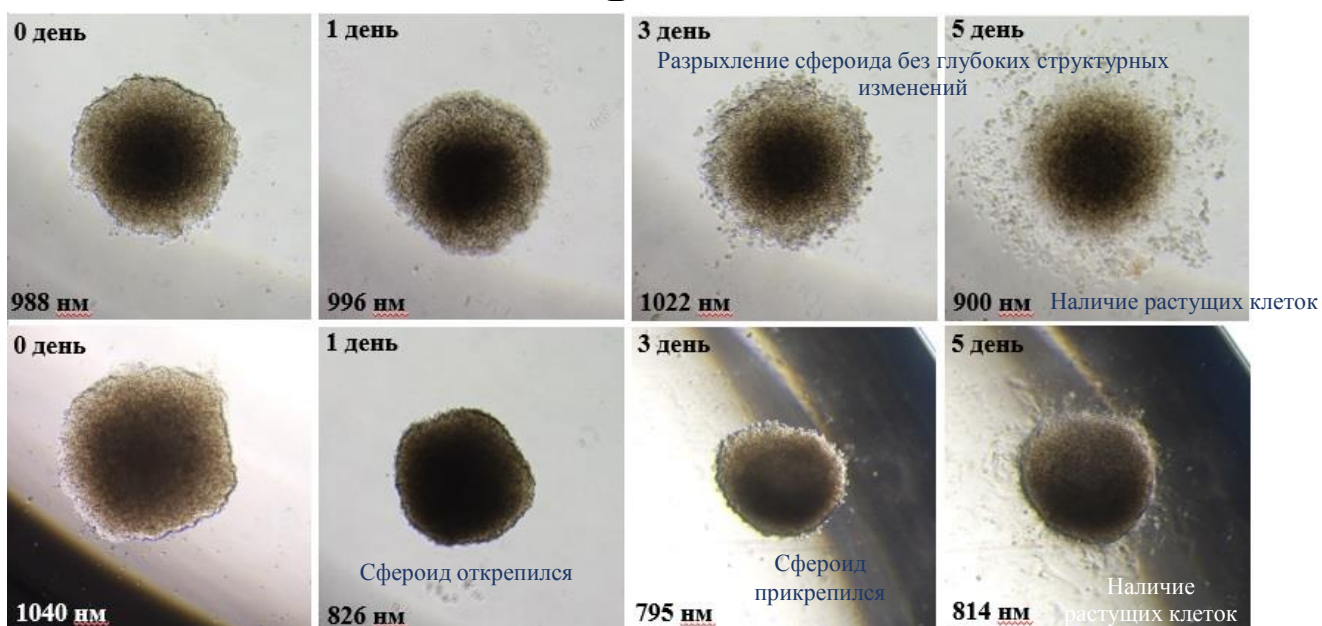


Рисунок 64 - Влияние протопорфирина IX на сфероиды T98G. (А) Контрольные (необработанные) сфероиды. (Б) Сфероиды, обработанные протопорфирином IX в концентрации 10 мкг/мл. Фотографии сфероидов сделаны с помощью светового микроскопа с 4-х кратным увеличением, в левом нижнем углу указаны размеры сфероидов

В отличие от клеточной линии T98G, в результате действия протопорфирина IX мы наблюдали более медленную пролиферацию клеток вокруг тумароидов из клеток линии LN-229 по сравнению с контролем (Рисунок 65). В остальном цитотоксический эффект от действия ФС на сфероиды был схожим: некоторые сфероиды откреплялись от поверхности пластика с последующим прикреплением и разрастанием клеточного слоя. Интересный эффект мы заметили в лунке, содержащей два сфероидов, где происходило открепление обоих сфероидов, за

которым следовало повторное их прикрепление, затем сфероиды сливались и начиналась активная пролиферация клеток вокруг них (Рисунок 65Б).

Таким образом, ФДТ с протопорфирином IX в качестве фотосенсибилизатора оказывает цитотоксическое действие на сфероиды T98G и LN-229, однако гибели клеток вокруг сфероида или значительных структурных изменений сфероидов обнаружено не было. Мы полагаем, что с повышением концентрации цитотоксическое действие от ФС будет усиливаться.

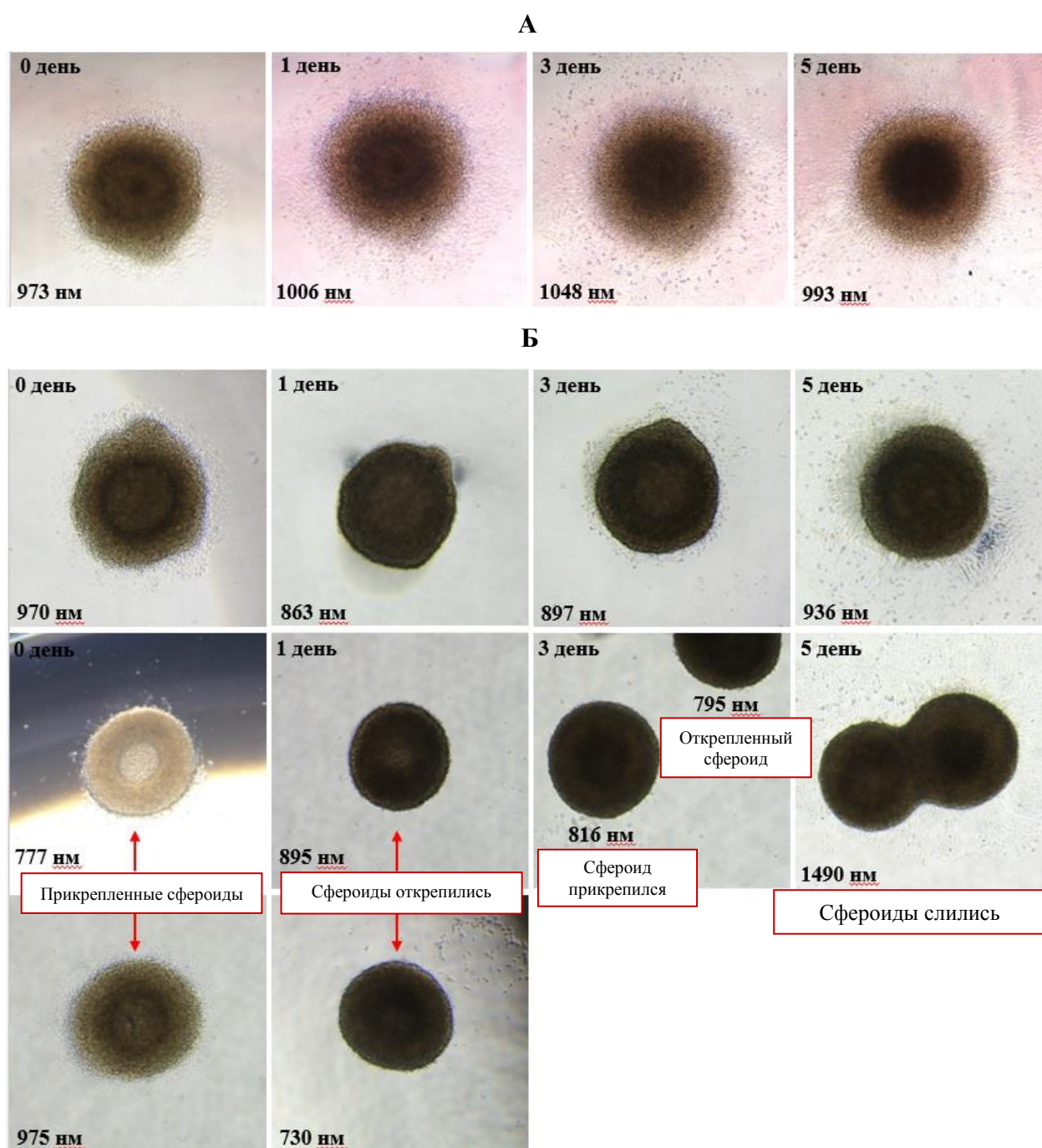


Рисунок 65 - Влияние протопорфирина IX на сфероиды LN-229. (А) Контрольные (необработанные) сфероиды. (Б) Сфероиды, обработанные протопорфирином IX в концентрации

10 мкг/мл. Фотографии сфероидов сделаны с помощью светового микроскопа с 4-х кратным увеличением, в левом нижнем углу указаны размеры сфероида

Мы показали, что монотерапия одним из методов не способна полностью разрушить опухолю и остановить пролиферацию клеток глиобластомы. Далее мы исследовали эффекты комбинированной терапии протопорфирином IX и ВВС. После инкубации сфероидов с протопорфирином IX в течение одного часа при концентрации 10 мкг/мл, ФС активировали светом с длиной волны 450 нм, а затем добавляли вирус в титре 10^5 ЦПД₅₀/мл и наблюдали за сфероидом в течение пяти дней. Мы заметили усиление противоопухолевых эффектов. В отличие от монотерапии одним из методов значительной пролиферации клеток вокруг сфероидов обнаружено не было (Рисунок 66, 67). Некоторые сфероиды отсоединялись и снова прикреплялись, аналогично тому, что мы наблюдали при монотерапии с использованием протопорфирина IX. При этом дальнейшее наблюдение показало эффекты похожие на действие вируса: разрыхление, потерю нативной структуры сфероидов и отсутствие пролиферации клеточного слоя. К пятому дню живые клетки практически отсутствовали или имели аномальную форму.

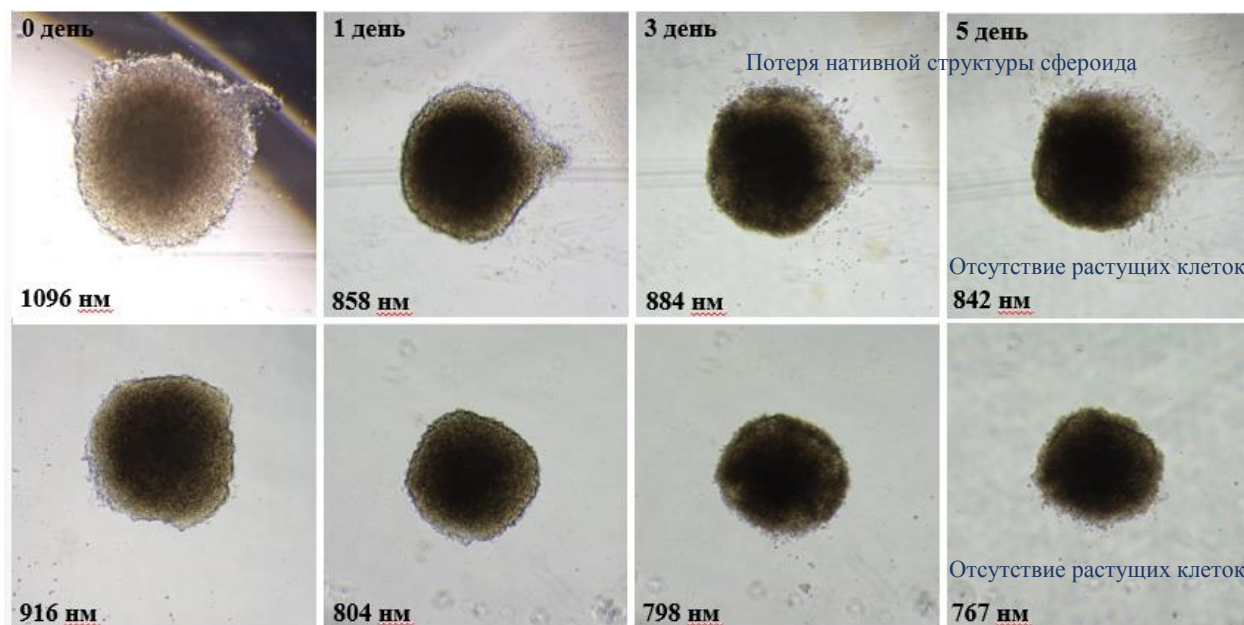


Рисунок 66 - Влияние комбинированной терапии протопорфирина IX и ВВС на сфероиды T98G. Сфероиды обработаны протопорфирином IX в концентрации 10 мкг/мл и вирусом в титре 10^5 ЦПД₅₀/мл. Фотографии сфероидов сделаны с помощью светового микроскопа с 4-х кратным увеличением, в левом нижнем углу указаны размеры сфероида

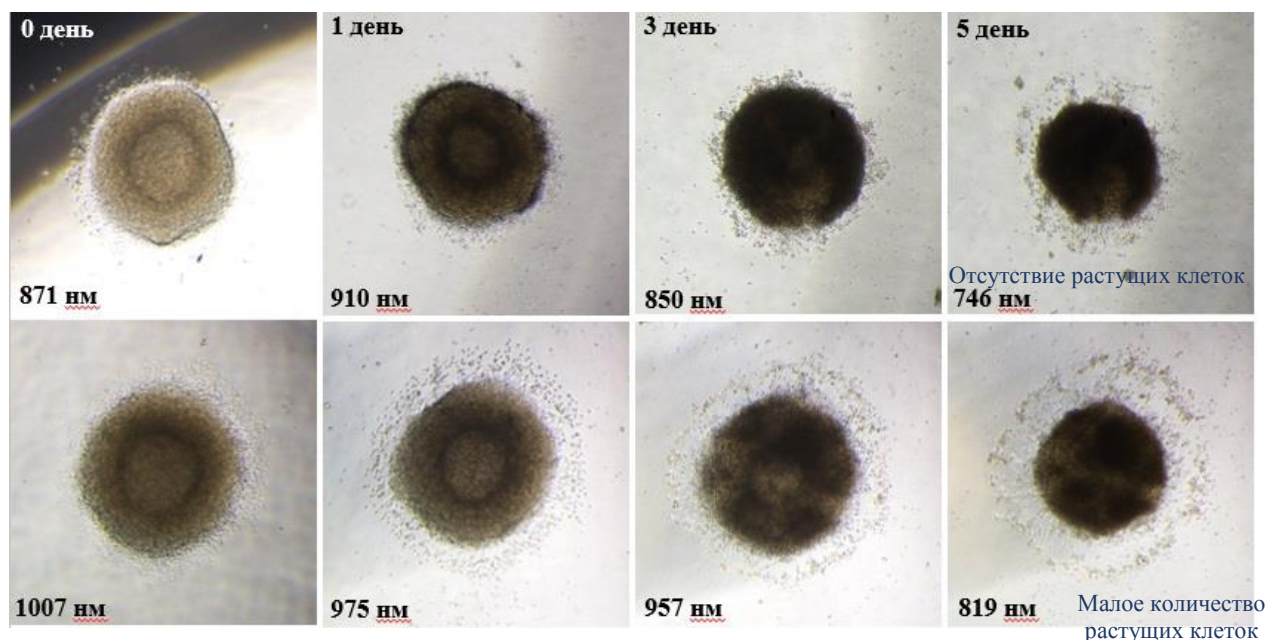


Рисунок 67 - Влияние комбинированной терапии протопорфирина IX и ВВС на сфероиды LN-229. Сфероиды обработаны протопорфирином IX в концентрации 10 мкг/мл и вирусом в титре 10^5 ЦПД₅₀/мл. Фотографии сфероидов сделаны с помощью светового микроскопа с 4-х кратным увеличением, в левом нижнем углу указаны размеры сфероида

Несмотря на выраженный литический эффект ВВС на клеточные линии глиобластомы T98G и LN-229, только комбинированная терапия с протопорфирином IX в качестве ФС приводила к полной гибели клеток и 3D - тканевых культур T98G и LN-229 при низкой дозе вируса. Однако, следует учесть, что такая терапия будет эффективна только в случае последовательного введения протопорфирина IX и ВВС. Для достижения максимального противоопухолевого эффекта необходимо соблюдать интервал между введением агентов минимум в 24 часа, чтобы избежать гибели вируса в результате действия АФК и самого протопорфирина IX. Таким образом, можно сделать вывод, что данный подход значительно повышает эффективность лечения изученных клеточных линий глиобластомы. Результаты исследований, представленные в разделе 3.4, опубликованы в работе [10].

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) является перспективным онколитическим агентом в отношении PDAC. Преимуществом штамма 17D ВЖЛ является факт его широкого использования в качестве вакцины против желтой лихорадки, что значительно упрощает возможную клиническую разработку стратегий иммунотерапии, включающих внутриопухолевые инъекции. Было показано, что штамм 17D ВЖЛ способен подавлять пролиферацию клеточных линий PDAC человека, эффективно проникать вглубь тумороидов и вызывать значительные структурные изменения в 3D-сфероидах культуры MIAPaCa-2, а также репродуцироваться в мышинной клеточной линии Pan02. Помимо этого, на

сингенной модели Pan02 было обнаружено, что штамм 17D ВЖЛ потенциально обладает иммуноопосредованным механизмом действия, и предварительная иммунизация животных значительно усиливает противоопухолевые эффекты терапии. Вклад противоопухолевого иммунитета в ингибирование роста опухоли был подтвержден в ранее упомянутом исследовании, где на модели меланомы B16-OVA и карциномы толстой кишки MC38 иммунизация с последующим введением штамма 17D ВЖЛ приводила к увеличению медианы выживаемости. Также было отмечено, что опухоли в значительной степени были инфильтрированы специфическими CD8⁺ лимфоцитами, и наблюдалась индукция синтеза IFN α/β . В нашем исследовании мы показали, что многократное внутриопухолевое введение вируса усиливает инфильтрацию опухоли иммунными клетками, хотя и снижает медиану выживаемости мышей, что требует дополнительного исследования с оптимизацией интервалов введения вируса.

На заключительном этапе работы была изучена комбинированная терапия ВВС с фотосенсибилизатором - протопорфирином IX. Был получен комплекс ВВС – протопорфирин IX, который хотя и оказывал цитотоксический эффект на клеточную линию глиобластомы T98G, продемонстрировал ограниченную терапевтическую эффективность из-за ингибирующего действия протопорфирина IX на ВВС. Однако при изменении протокола терапии - последовательном введении фотосенсибилизатора и ВВС с интервалом в 24 часа - удалось существенно повысить эффективность комбинированной терапии. Также синергия ВВС и протопорфирина IX была продемонстрирована на 3D-сфероидах глиобластомы. Полученные результаты согласуются с рядом независимых исследований, демонстрирующих потенциал сочетания ФДТ и ОВ, однако, в данных работах были использованы другие вирусы, такие как 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 Саран-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 от пациента), аденокарциномы молочной железы (MCF7, MDA-MB-231), аденокарциномы протоков поджелудочной железы человека (MIAPaCa-2, PANC-1, Саран-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 $53 \pm 10\%$). 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, Сарап-2), а также разрушает 3D-сфероиды MIAPaCa-2.

4. Вирус желтой лихорадки (штамм 17D) способен к репродукции в мышинных 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) могут быть использованы 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 мышинной 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 сокращений и условных обозначений

АФК – активные формы кислорода

БОЕ — бляшкообразующая единица

ВВС — вирус везикулярного стоматита

ВВС–Cyanine5.5 – комплекс вируса везикулярного стоматита и флуоресцентной метки Cyanine5.5

ВВС-протопорфирин IX — комплекс вируса везикулярного стоматита и протопорфирина IX

ВЖЛ — вирус желтой лихорадки

ВЗН – вирус Западного Нила

ВКЭ — вирус клещевого энцефалита

ВПГ-1 — вирус простого герпеса первого типа

ГАГ — гликозаминогликаны

ДМСО — диметилсульфоксид

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКТ —иммунные контрольные точки

ОВ – онколитический вирус (онколитические вирусы)

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РНК — рибонуклеиновая кислота

ФС — фотосенсибилизатор

ФДТ — фотодинамическая терапия

ЦНС – центральная нервная система

ЦПД — цитопатогенное действие

ЭПР — эндоплазматический ретикулум

CD4+ — cluster of Differentiation 4 positive, Т-хелперные клетки

CD8+ — cluster of Differentiation 8 positive, цитотоксические Т-лимфоциты

CD20+ — cluster of Differentiation 20 positive, В-лимфоциты, экспрессирующие антиген CD20

CD24 — cluster of Differentiation 24, рецепторный гликопротеин CD24

CD155/PVR — рецептор полиовируса

CSC — Cancer Stem Cells, опухолевые стволовые клетки

DAMP — damage-associated molecular patterns, молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

DMEM-VERO — питательная среда DMEM, полученная в результате культивирования клеточной линии Vero

eIF2 α — eukaryotic Initiation Factor 2 alpha, эукариотический фактор инициации трансляции 2 альфа

EGF — epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста

EMT — epithelial to mesenchymal transition, эпителиально-мезенхимальный переход

FBS — fetal bovine serum, эмбриональная телячья сыворотка

G-CSF — granulocyte colony-stimulating factor, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

HIF — hypoxia-inducible factor, фактор, индуцируемый гипоксией

IFN α/β — интерферон альфа/бета

IFN- α 2a — интерферон альфа-2a

IL-6 — интерлейкин-6

IRES — internal ribosome entry site, внутренний сайт посадки рибосомы

ISG — interferon-stimulated genes, интерферон-стимулируемые гены

MAPK — mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа

MOI — multiplicity of infection, множественность заражения

MxA — myxovirus resistance protein A, белок устойчивости к миксовирусам A

NK-клетки — natural killer cells, естественные киллеры

OVA — ovalbumin, овальбумин

PAMP — pathogen-associated molecular patterns, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PBS — phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер

PDAC — pancreatic ductal adenocarcinoma, аденокарцинома протоков поджелудочной железы

PI3K — phosphoinositide 3-Kinase, фосфоинозитид-3-киназа

PVR — poliovirus receptor, рецептор полиовируса

TCID₅₀ — tissue culture infectious dose 50, инфекционная доза, обеспечивающая 50%-ую клеточную гибель

TNF- α — tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли альфа

TGF- β — transforming growth factor beta, трансформирующий фактор роста бета

xCELLigence — система прижизненного мониторинга клеточной пролиферации
xCELLigenceReal-Time Cell Proliferation Measurement

Список литературы

1. Nevala-Plagemann, C. From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer / C. Nevala-Plagemann, M. Hidalgo, I. Garrido-Laguna // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 17. – № 2. – P. 108-123. DOI: 10.1038/s41571-019-0281-6.
2. Delgado-López, P.D. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities | *Clinical and Translational Oncology* / P.D. Delgado-López, E.M. Corrales-García. – 2016. – Vol. 18. – P. 1062-1071. DOI: 10.1007/s12094-016-1497-x.
3. Matos, A.L. de. Oncolytic Viruses and the Immune System: The Dynamic Duo / A.L. de Matos, L.S. Franco, G. McFadden // *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*. – 2020. – Vol. 17. – P. 349-358. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.01.001.
4. Tomoki, T. Intratumoral oncolytic herpes virus G47Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial / T. Tomoki, I. Hirotaka, O. Hiroshi, O. Yasunori. [et al] // *Nature Medicine* – 2022. – Vol. 28. – P. 1630-1639. DOI: 10.1038/s41591-022-01897-x.
5. Frampton, J.E. Teserpaturev/G47Δ: First Approval / J.E. Frampton // *BioDrugs*. – 2022. – Vol. 36. – № 5. – P. 667-672. DOI: 10.1007/s40259-022-00553-7.
6. Piranlioglu, R. Oncolytic virus-mediated immunomodulation in glioblastoma: Insights from clinical trials and challenges / R. Piranlioglu, E.A. Chiocca // *Seminars in Immunology*. – 2025. – Vol. 79. – P. 101975. DOI: 10.1016/j.smim.2025.101975.
7. Hamidi-Sofiani, V. Oncolytic Viruses and Pancreatic Cancer / V. Hamidi-Sofiani, R. Rakhshi, N. Moradi, [et al.] // *Cancer Treatment and Research Communications*. – 2022. – Vol. 31. – Article number: 100563. DOI: 10.1016/j.ctarc.2022.100563.
8. Ageenko A. Combination of Oncolytic Virotherapy with Different Antitumor Approaches against Glioblastoma / A. Ageenko, N. Vasileva, V. Richter, [et al] // *Int. J. Mol. Sci* - 2024 - Vol. 25. – Article number: 2042. DOI: 10.3390/ijms25042042.
9. Wang Y. The combination therapy of oncolytic virotherapy / Y. Wang, M. Zhu, H. Chi, [et al] // *Front. Pharmacol* - 2024 - Vol. 15. – Article number: 1380313. DOI: 10.3389/fphar.2024.1380313.

10. Nazarenko A.S. Viral-Porphyrin Combo: Photodynamic and Oncolytic Viral Therapy for Potent Glioblastoma Treatment / A.S. Nazarenko, A.O. Shkirdova, E.A. Orlova, [et al] // *Int. J. Mol. Sci* - 2024 - Vol. 25. – Article number: 12578. DOI: 10.3390/ijms252312578
11. Mirbahari, S.N. Recent progress in combination therapy of oncolytic vaccinia virus / S.N. Mirbahari, M. Da Silva, A.I.M. Zúñiga [et al] // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15. – Article number: 1272351. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1272351
12. Moore, A.E. Inhibition of growth of five transplantable mouse tumors by the virus of Russian far east encephalitis / A.E. Moore // *Cancer*. - 1951. – Vol. 4. – № 2. – P. 375-382. DOI: 10.1002/1097-0142(195103)4:2<375::aid-cnrcr2820040227>3.0.co;2-a.
13. Moore, A.E. The destructive effect of the virus of russian far east encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180 / A.E. Moore // *Cancer*. - 1949. – Vol. 2. – № 3. – P. 525-534. DOI: 10.1002/1097-0142(194905)2:3<525::aid-cnrcr2820020317>3.0.co;2-o.
14. Aznar, M.A. Repurposing the yellow fever vaccine for intratumoral immunotherapy / M.A. Aznar, C. Molina, A. Teijeira [et al] // *EMBO Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 12. – № 1. – Article number: e10375. DOI: 10.15252/emmm.201910375.
15. McAllister, A. Recombinant Yellow Fever Viruses Are Effective Therapeutic Vaccines for Treatment of Murine Experimental Solid Tumors and Pulmonary Metastases / A. McAllister, A.E. Arbetman, S. Mandl, [et al] // *Journal of Virology*. – 2000. – Vol. 74. – № 19. – P. 9197-9205. DOI: 10.1128/jvi.74.19.9197-9205.2000.
16. Gil, M. Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice / M. Gil, M. Bieniasz, M. Seshadri, [et al] // *British Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 105. – № 10. – P. 1512-1521. DOI: 10.1038/bjc.2011.429.
17. Khaled, Y.S. Anti-cancer effects of oncolytic viral therapy combined with photodynamic therapy in human pancreatic cancer cell lines / Y.S. Khaled, K. Wright, A. Melcher, [et al] // *The Lancet*. - 2015. – Vol. 56. – P. 385. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60371-3.

18. Li, Y. The integrated treatment of photodynamic therapy and oncolytic Virotherapy: A dual-modal paradigm for breast Cancer / Y. Li, K. Wang, Q. Min, [et al] // ScienceDirect. – 2025. – Vol. 272. – Article number: 113248. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2025.113248.
19. Shimizu, K. Photodynamic augmentation of oncolytic virus therapy for central nervous system malignancies / K. Shimizu, A. Kahramanian, MADA. Jabbar, [et al] // ScienceDirect. – 2023. – Vol. 572. – Article number: 216363. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216363.
20. García-Romero, C. Arboviruses in Mammals in the Neotropics: A Systematic Review to Strengthen Epidemiological Monitoring Strategies and Conservation Medicine / C. García-Romero, G.A. Carrillo Bilbao, J.C. Navarro, [et al] // Viruses– 2023. – Vol. 15. – № 2. – Article number: 417. DOI: 10.3390/v15020417.
21. Назаренко, А.С. Перспективы использования альфавирусов в противоопухолевой терапии / А.С. Назаренко, Ю.К. Бирюкова, Н.М. Колясникова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2023. – Т. 13. – № 4. – С. 627–641. DOI: 10.15789/2220-7619-PFA-12111.
22. Li, J.K. Oncolytic Bluetongue Viruses: Promise, Progress, and Perspectives / J.K. Li // Front Microbiol. – 2011. – Vol. 2. – Article number: 46. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00046.
23. Wang, H. Bluetongue Viruses Act as Novel Oncolytic Viruses to Effectively Inhibit Human Renal Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo / H. Wang, L. Song, X. Zhang, [et al] // Med Sci Monit. – 2021. – Vol. 28. – Article number: e930634. DOI: 10.12659/MSM.930634.
24. Barrows, N.J. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses / N.J. Barrows, R.K. Campos, K.C. Liao, [et al] // Chem Rev. – 2018. – Vol. 118. – № 8. – P. 4448-4482. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00719.
25. Maramorosch, K. The Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution / K. Maramorosch, T. J. Chambers, A. J. Shatkin, [et al] - Academic Press – 2003. – Vol. 59. – P. 332-383.

26. Perera-Lecoin, M. Flavivirus Entry Receptors: An Update / M. Perera-Lecoin, L. Meertens, X. Carnec, [et al] // *Viruses*. – 2013. – Vol. 6. – № 1. – P. 69-88. DOI: 10.3390/v6010069.
27. Apte-Sengupta, S. Coupling of replication and assembly in flaviviruses: Virus replication animals and plants / Roseoloviruses / S. Apte-Sengupta, D. Sirohi, R.J. Kuhn, // *Current Opinion in Virology*. – 2014. – Vol. 9. – P. 134-142. DOI: 10.1016/j.coviro.2014.09.020.
28. Nazarenko, A.S. Flaviviruses in AntiTumor Therapy / A.S. Nazarenko, M.F. Vorovitch, Y.K. Biryukova [et al] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 10. – Article number: 1973. DOI: 10.3390/v15101973.
29. Libikova, H. Comparative study of the viruses of the tick encephalitis group in HeLa cell cultures / H. Libikova // *Acta Virol.* – 1959. – Vol. 3. – P. 41-50.
30. Levkovich, E.N. Inhibitory action of viruses of the tick-borne encephalitis complex differing in neurovirulence on mouse tumors in vivo / E.N. Levkovich, G.I. Sergeeva // *Bull Exp Biol Med.* – 1967. – Vol. 64. – P. 885-887. DOI: 10.1007/BF00786290.
31. Růžek, D. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection / D. Růžek, M. Vancová, M. Tesařová, [et al] // *J Gen Virol.* – 2009. – Vol. 90. – № 7. P. 1649-1658. DOI: 10.1099/vir.0.010058-0.
32. Sergeeva, G.I. A study of the features of reproduction in tumor cells in vitro and in vivo of different viruses of the tick-borne encephalitis complex, possessing various degrees of neurovirulence] / G.I. Sergeeva, E.N. Levkovich // *Voprosy Virusologii.* – 1966. – Vol. 11. – № 5. – P. 539-545.
33. Buckley, S.M. The effect of St. Louis encephalitis virus on transplantable Crocker mouse sarcoma 180 / S.M. Buckley, J.J. Buckley, A.E. Snipes // *Cancer.* – 1951. – Vol. 4. – № 2. – P. 367-374. DOI: 10.1002/1097-0142(195103)4:2<367::aid-cncr2820040226>3.0.co;2-8.
34. Mettler, N.E. Virus inoculation in mice bearing Ehrlich ascitic tumors: antigen production and tumor regression / N.E. Mettler, D.H. Clark, J. Casals // *Infection and Immunity.* – 1982. – Vol. 37, No. 1. – P. 23–27. DOI: 10.1128/iai.37.1.23-27.1982.

35. Webb, H.E. Leukaemia and neoplastic processes treated with Langat and Kyasanur Forest disease viruses: a clinical and laboratory study of 28 patients. / H.E. Webb, G. Wetherley-Mein, C.E. Smith, D. McMahon // *British Medical Journal*. – 1966. – Vol. 1. – № 5482. – P. 258-266.
36. Qi, Z. Live-attenuated Japanese encephalitis virus inhibits glioblastoma growth and elicits potent antitumor immunity / Z. Qi, J. Zhao, Y. Li, [et al] // *Frontiers in Immunology* – 2023. – Vol. 14. – Article number: 982180. DOI: 10.3389/fimmu.2023.982180.
37. Wood, H. Neuro-oncology: A new role for Zika virus in glioblastoma therapy? / H. Wood // *Nature Reviews. Neurology*. – 2017. – Vol. 13. – № 11. – P. 640-641. DOI: 10.1038/nrneurol.2017.138.
38. Liu, J. Attenuated WNV-poly(A) exerts a broad-spectrum oncolytic effect by selective virus replication and CD8⁺ T cell-dependent immune response / J. Liu, Y.-Y. Hu, Q.-Y. Zhang [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2023. – Vol. 158. – P. 114094. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114094.
39. Figueiredo, C.P. Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice / C.P. Figueiredo, F.G.Q. Barros-Aragão, R.L.S. Neris [et al.] // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 3890. DOI: 10.1038/s41467-019-11866-7.
40. Garcez, P.P. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids / P.P. Garcez, E.C. Loiola, R. Madeiro da Costa [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2016. – Vol. 352. – № 6287. – P. 816-818. DOI: 10.1126/science.aaf6116.
41. Nowakowski, T.J. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells / T.J. Nowakowski, A.A. Pollen, E. Di Lullo [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2016. – Vol. 18. – № 5. – P. 591-596. DOI: 10.1016/j.stem.2016.03.012.
42. Wells, M.F. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection / M.F. Wells, M.R. Salick, O. Wiskow [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2016. – Vol. 19. – № 6. – P. 703-708. DOI: 10.1016/j.stem.2016.11.011.

43. Altevogt, P. Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer / P. Altevogt, M. Sammar, L. Hüser, G. Kristiansen // *International Journal of Cancer*. – 2021. – Vol. 148. – № 3. – P. 546-559. DOI: 10.1002/ijc.33249.
44. Mazar, J. Zika virus as an oncolytic treatment of human neuroblastoma cells requires CD24 / J. Mazar, Y. Li, A. Rosado [et al.] // *PloS One*. – 2018. – Vol. 13. – № 7. – P. e0200358. DOI: 10.1371/journal.pone.0200358.
45. Li, H. Zika virus NS5 protein inhibits cell growth and invasion of glioma / H. Li, Y. Hu, J. Huang [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2019. – Vol. 516. – № 2. – P. 515-520. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.06.064.
46. Zhu, Z. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells / Z. Zhu, M.J. Gorman, L.D. McKenzie [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2017. – Vol. 214. – № 10. – P. 2843-2857. DOI: 10.1084/jem.20171093.
47. Benedict, C.A. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis / C.A. Benedict, P.S. Norris, C.F. Ware // *Nature Immunology*. – 2002. – Vol. 3. – № 11. – P. 1013-1018. DOI: 10.1038/ni1102-1013.
48. Mlera, L. The role of viral persistence in flavivirus biology / L. Mlera, W. Melik, M.E. Bloom // *Pathogens and Disease*. – 2014. – Vol. 71. – № 2. – P. 137-163. DOI: 10.1111/2049-632X.12178.
49. Nagata, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells / S. Nagata // *Annual Review of Immunology*. – 2018. – Vol. 36. – P. 489-517. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010.
50. Nair, S. Zika virus oncolytic activity requires CD8⁺ T cells and is boosted by immune checkpoint blockade / S. Nair, L. Mazzocchi, A. Jash [et al.] // *JCI insight*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. e144619, 144619. DOI: 10.1172/jci.insight.144619.
51. Taylor, O.G. Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets / O.G. Taylor, J.S. Brzozowski, K.A. Skelding // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 963. DOI: 10.3389/fonc.2019.00963.
52. Kaid, C. Zika Virus Selectively Kills Aggressive Human Embryonal CNS Tumor Cells In Vitro and In Vivo / C. Kaid, E. Goulart, L.C. Caires-Júnior [et al.] // *Cancer*

Research. – 2018. – Vol. 78. – № 12. – P. 3363-3374. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3201.

53. Kaid, C. Safety, Tumor Reduction, and Clinical Impact of Zika Virus Injection in Dogs with Advanced-Stage Brain Tumors / C. Kaid, R.A.D.S. Madi, R. Astray [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2020. – Vol. 28. – № 5. – P. 1276-1286. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.03.004.

54. Chen, Q. Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate / Q. Chen, J. Wu, Q. Ye [et al.] // *mBio*. – 2018. – Vol. 9. – № 5. – P. e01683-18. DOI: 10.1128/mBio.01683-18.

55. Zhu, Z. Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin $\alpha v \beta 5$ Axis / Z. Zhu, P. Mesci, J.A. Bernatchez [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2020. – Vol. 26. – № 2. – P. 187-204.e10. DOI: 10.1016/j.stem.2019.11.016.

56. Chen, L. Oncolytic Zika virus promotes intratumoral T cell infiltration and improves immunotherapy efficacy in glioblastoma / L. Chen, C. Zhou, Q. Chen [et al.] // *Molecular Therapy Oncolytics*. – 2022. – Vol. 24. – P. 522-534. DOI: 10.1016/j.omto.2022.01.011.

57. World Health Organization, null. WHO position on the use of fractional doses - June 2017, addendum to vaccines and vaccination against yellow fever WHO: Position paper - June 2013 / null World Health Organization // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – № 43. – P. 5751-5752. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.06.087.

58. Southam, C.M. West Nile, Ilheus, and Bunyamwera Virus Infections in Man. / C.M. Southam, A.E. Moore // *American Journal of Tropical Medicine*. – 1951. – Vol. 31. – № 6. – P. 724-41.

59. Southam, C.M. Clinical Studies of Viruses as Antineoplastic Agents, With Particular Reference to Egypt 101 Virus. / C.M. Southam, A.E. Moore // *Cancer*. – 1952. – Vol. 5. – № 5. – P. 1025-1033.

60. Zhang, Y.-N. Rational design of West Nile virus vaccine through large replacement of 3' UTR with internal poly(A) / Y.-N. Zhang, N. Li, Q.-Y. Zhang [et al.] // *EMBO Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 13. – № 9. – P. e14108. DOI: 10.15252/emmm.202114108.

61. Hall, R.A. Kunjin virus: an Australian variant of West Nile? / R.A. Hall, J.H. Scherret, J.S. Mackenzie // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 951. – P. 153-160.
62. Harvey, T.J. Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles / T.J. Harvey, W.J. Liu, X.J. Wang [et al.] // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78. – № 1. – P. 531-538. DOI: 10.1128/jvi.78.1.531-538.2004.
63. Khromykh, A.A. Encapsidation of the flavivirus kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans / A.A. Khromykh, A.N. Varnavski, E.G. Westaway // *Journal of Virology*. – 1998. – Vol. 72. – № 7. – P. 5967-5977. DOI: 10.1128/JVI.72.7.5967-5977.1998.
64. Hoang-Le, D. A Kunjin replicon vector encoding granulocyte macrophage colony-stimulating factor for intra-tumoral gene therapy / D. Hoang-Le, L. Smeenk, I. Anraku [et al.] // *Gene Therapy*. – 2009. – Vol. 16. – № 2. – P. 190-199. DOI: 10.1038/gt.2008.169.
65. Herd, K.A. Recombinant Kunjin virus replicon vaccines induce protective T-cell immunity against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour / K.A. Herd, T. Harvey, A.A. Khromykh, R.W. Tindle // *Virology*. – 2004. – Vol. 319. – № 2. – P. 237-248. DOI: 10.1016/j.virol.2003.10.032.
66. Harvey, T.J. Kunjin virus replicon vectors for human immunodeficiency virus vaccine development / T.J. Harvey, I. Anraku, R. Linedale [et al.] // *Journal of Virology*. – 2003. – Vol. 77. – № 14. – P. 7796-7803. DOI: 10.1128/jvi.77.14.7796-7803.2003.
67. Yu, Y. Phenotypic and genotypic characteristics of Japanese encephalitis attenuated live vaccine virus SA14-14-2 and their stabilities / Y. Yu // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № 21. – P. 3635-3641. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.02.105.
68. Goldufsky, J.W. Attenuated Dengue virus PV001-DV induces oncolytic tumor cell death and potent immune responses / J.W. Goldufsky, P. Daniels, M.D. Williams, [et al.]. – *J Transl Med*. - 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 483. DOI: 10.1186/s12967-023-04344-8.
69. Lichty, B.D. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet / B.D. Lichty, A.T. Power, D.F. Stojdl, J.C. Bell // *Trends in Molecular Medicine*. – 2004. – Vol. 10. – № 5. – P. 210-216. DOI: 10.1016/j.molmed.2004.03.003.

70. Assenberg, R. Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription : The VIZIER project: deciphering the world of RNA viruses / R. Assenberg, O. Delmas, B. Morin [et al.] // *Antiviral Research*. – 2010. – Vol. 87. – № 2. – P. 149-161. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.02.322.
71. Albertini, A.A.V. Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry / A.A.V. Albertini, E. Baquero, A. Ferlin, Y. Gaudin // *Viruses*. – 2012. – Vol. 4. – № 1. – P. 117-139. DOI: 10.3390/v4010117.
72. Dietzgen, R.G. The family *Rhabdoviridae*: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins / R.G. Dietzgen, H. Kondo, M.M. Goodin [et al.] // *Virus Research*. – 2017. – T. 227. – C. 158-170. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.10.010.
73. Rhabdoviridae - ViralZone [сайт]. URL: <https://www.modelarchive.org/DOI/10.5452/ma-jd-viral>. (Дата обращения: 28.08.2026).
74. Reis, J.L.Jr Transmission and pathogenesis of vesicular stomatitis viruses / J.L.R. Jr, D. Mead, L.L. Rodriguez, C.C. Brown. – 2009. – Vol. 2. – № 1. – P. BJVP. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.002010.
75. Abdelmageed, A.A. Employing the Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus in Cancer Virotherapy: Resistance and Clinical Considerations / A.A. Abdelmageed, S. Dewhurst, M.C. Ferran // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17. – № 1. – Article number: 16. DOI: 10.3390/v17010016.
76. Breitbach, C.J. Targeting Tumor Vasculature With an Oncolytic Virus / C.J. Breitbach, N.S.D. Silva, T.J. Falls [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2011. – Vol. 19. – № 5. – P. 886-894. DOI: 10.1038/mt.2011.26.
77. Stojdl, D.F. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents / D.F. Stojdl, B.D. Lichty, B.R. tenOever, [et al.] // *Cancer Cell*. – 2003. – Vol. 4. – № 4. – P. 263-275. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00241-1.

78. Stojdl, D.F. Exploiting Tumor-Specific Defects in the Interferon Pathway with a Previously Unknown Oncolytic Virus / D.F. Stojdl, B. Lichty, S. Knowles, [et al.] // *Nature Medicine*. – 2000. – Vol. 6. – № 7. – P. 821-825. DOI: 10.1038/77558.
79. Balachandran, S. Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Therapy of Tumors / S. Balachandran, G.N. Barber // *IUBMB Life*. – 2000. – Vol. 50. – № 2. – P. 135-138. DOI: 10.1080/713803696.
80. Fernandez, M. Genetically Engineered Vesicular Stomatitis Virus in Gene Therapy: Application for Treatment of Malignant Disease / M. Fernandez, M. Porosnicu, D. Markovic, [et al.] // *Journal of Virology*. – 2002. – Vol. 76. – № 2. – P. 895-904. DOI: 10.1128/jvi.76.2.895-904.2002.
81. Hastie, E. Vesicular Stomatitis Virus as a Flexible Platform for Oncolytic Virotherapy Against Cancer / E. Hastie, V.Z. Grdzlishvili // *Journal of General Virology*. – 2012. – Vol. 93. – Pt. 12. – P. 2529-2545. DOI: 10.1099/vir.0.046672-0.
82. Johnson, J.E. Neurovirulence Properties of Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vectors in Non-Human Primates / J.E. Johnson, F. Nasar, J.W. Coleman, [et al.] // *Virology*. – 2007. – Vol. 360. – № 1. – P. 36-49. DOI: 10.1016/j.virol.2006.10.026.
83. Jenks, N. Safety Studies on Intrahepatic or Intratumoral Injection of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Expressing Interferon- β in Rodents and Nonhuman Primates / N. Jenks, R. Myers, S.M. Greiner [et al.] // *Human Gene Therapy*. – 2010. – Vol. 21. – № 4. – P. 451-462. DOI: 10.1089/hum.2009.111.
84. Patel, M.R. Vesicular stomatitis virus expressing interferon- β is oncolytic and promotes antitumor immune responses in a syngeneic murine model of non-small cell lung cancer / M.R. Patel, B.A. Jacobson, Y. Ji [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 32. – P. 33165-33177. DOI: 10.18632/oncotarget.5320.
85. Udayakumar, T.S. Radiation Attenuates Prostate Tumor Antiviral Responses to Vesicular Stomatitis Virus Containing IFN β , Resulting in Pronounced Antitumor Systemic Immune Responses / T.S. Udayakumar, D.M. Betancourt, A. Ahmad [et al.] // *Molecular Cancer Research*. – 2020. – Vol. 18. – № 8. – P. 1232-1243. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0836.

86. Moglan, A.M. Preclinical Efficacy of Oncolytic VSV-IFN β in Treating Cancer: A Systematic Review / A.M. Moglan, O.A. Albaradie, F.F. Alsayegh, [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1085940. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1085940.
87. Cook, J. Clinical Activity of Single-Dose Systemic Oncolytic VSV Virotherapy in Patients with Relapsed Refractory T-Cell Lymphoma / J. Cook, K.W. Peng, T.E. Witzig, [et al.] // *Blood Advances*. – 2022. – Vol. 6. – № 11. – P. 3268-3279. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021006631.
88. McGarrah, P.W. Phase 1/2 Trial of Vesicular Stomatitis Virus Expressing Human Interferon- β and NIS (VSV-IFN β -NIS), with Pembrolizumab, in Patients with Neuroendocrine Carcinoma / P.W. McGarrah et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2023. – Vol. 41. – Suppl. 4. – P. TPS657-TPS657. DOI: 10.1200/JCO.2023.41.4_suppl.TPS657.
89. Vorona, K.A. Recombinant VSVs: A Promising Tool for Virotherapy / K.A. Vorona, V.D. Moroz, N.B. Gasanov, [et al.] // *Acta Naturae*. – 2024. – Vol. 16. – № 4. – P. 4-14. DOI: 10.32607/actanaturae.27501.
90. Ahmed, M. Sensitivity of Prostate Tumors to Wild Type and M Protein Mutant Vesicular Stomatitis Viruses / M. Ahmed, S.D. Cramer, D.S. Lyles // *Virology*. – 2004. – Vol. 330. – № 1. – P. 34-49. DOI: 10.1016/j.virol.2004.08.039.
91. Gray, Z. M51R and Delta-M51 Matrix Protein of the Vesicular Stomatitis Virus Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells / Z. Gray, A. Tabarraei, A. Moradi, [et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2019. – Vol. 46. – № 3. – P. 3371-3379. DOI: 10.1007/s11033-019-04799-3.
92. Day, G.L. Immune Effects of M51R Vesicular Stomatitis Virus Treatment of Carcinomatosis From Colon Cancer / G.L. Day, M.L. Bryan, S.A. Northrup [et al.] // *Journal of Surgical Research*. – 2020. – Vol. 245. – P. 127-135. DOI: 10.1016/j.jss.2019.07.032.
93. Ebert, O. Systemic Therapy of Experimental Breast Cancer Metastases by Mutant Vesicular Stomatitis Virus in Immune-Competent Mice / O. Ebert, S. Harbaran, K. Shinozaki, [et al.] // *Cancer Gene Therapy*. – 2005. – Vol. 12. – № 4. – P. 350-358. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700794.

94. Ahmed, M. Immune Response in the Absence of Neurovirulence in Mice Infected with M Protein Mutant Vesicular Stomatitis Virus / M. Ahmed, T.R. Marino, S. Puckett, [et al.] // *Journal of Virology*. – 2008. – Vol. 82. – № 18. – P. 9273-9277. DOI: 10.1128/JVI.00915-08.
95. Murphy, A.M. Vesicular Stomatitis Virus as an Oncolytic Agent Against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / A.M. Murphy, D.M. Besmer, M. Moerdyk-Schauwecker, [et al.] // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – № 6. – P. 3073-3087. DOI: 10.1128/JVI.05640-11.
96. Tober, R. VSV-GP: a Potent Viral Vaccine Vector That Boosts the Immune Response upon Repeated Applications / R. Tober, Z. Banki, L. Egerer [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 9. – P. 4897-4907. DOI: 10.1128/jvi.03276-13.
97. Muik, A. Re-engineering Vesicular Stomatitis Virus to Abrogate Neurotoxicity, Circumvent Humoral Immunity, and Enhance Oncolytic Potency / A. Muik, L.J. Stubbert, R.Z. Jahedi, [et al.] // *Cancer Research*. – 2014. – Vol. 74. – № 13. – P. 3567-3578. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3306.
98. Urbiola, C. Oncolytic Activity of the Rhabdovirus VSV-GP Against Prostate Cancer / C. Urbiola, F.R. Santer, M. Petersson, [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2018. – Vol. 143. – № 7. – P. 1786-1796. DOI: 10.1002/ijc.31556.
99. Schreiber, L.M. The Lytic Activity of VSV-GP Treatment Dominates the Therapeutic Effects in a Syngeneic Model of Lung Cancer / L.M. Schreiber, C. Urbiola, K. Das, [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 121. – № 8. – P. 647-658. DOI: 10.1038/s41416-019-0574-7.
100. Bayne, R.S. MAP3K7 and CHD1 Are Novel Mediators of Resistance to Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus in Prostate Cancer Cells / R.S. Bayne, S. Puckett, L.U. Rodrigues [et al.] // *Molecular Therapy - Oncolytics*. – 2020. – Vol. 17. – P. 496-507. DOI: 10.1016/j.omto.2020.05.004.
101. Moerdyk-Schauwecker, M. Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: Role of type I interferon signaling / M. Moerdyk-Schauwecker, N.R. Shah, A.M. Murphy [et al.] // *Virology*. – 2013. – Vol. 436. – № 1. – P. 221-234. DOI: 10.1016/j.virol.2012.11.014.

102. Guo, B. Increased VSV Oncolytic Sensitivity in Tumor Cells by Down-Regulation of Mx1 Gene Expression / B. Guo, B. Hu, L. Zhao, [et al.] // International Journal of Clinical and Experimental Medicine. – 2016. – Vol. 9. – № 3. – P. 3741-3746.
103. Huff, A.L. APOBEC3 Mediates Resistance to Oncolytic Viral Therapy / A.L. Huff, P. Wongthida, T. Kottke [et al.] // Molecular Therapy - Oncolytics. – 2018. – Vol. 11. – P. 1-13. DOI: 10.1016/j.omto.2018.08.003.
104. Baltzis, D. Resistance to Vesicular Stomatitis Virus Infection Requires a Functional Cross Talk between the Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 α Kinases PERK and PKR / D. Baltzis, L.-K. Qu, S. Papadopoulou [et al.] // Journal of Virology. – 2004. – Vol. 78. – № 23. – P. 12747-12761. DOI: 10.1128/jvi.78.23.12747-12761.2004.
105. Liu, Y.P. Induction of Antiviral Genes by the Tumor Microenvironment Confers Resistance to Virotherapy / Y.P. Liu, L. Suksanpaisan, M.B. Steele, [et al.] // Scientific Reports. – 2013. – Vol. 3. – Article number: 2375. DOI: 10.1038/srep02375.
106. Kottke, T. Treg Depletion-enhanced IL-2 Treatment Facilitates Therapy of Established Tumors Using Systemically Delivered Oncolytic Virus / T. Kottke, F. Galivo, P. Wongthida [et al.] // Molecular Therapy. – 2008. – Vol. 16. – № 7. – P. 1217-1226. DOI: 10.1038/mt.2008.83.
107. Altomonte, J. Exponential Enhancement of Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Potency by Vector-Mediated Suppression of Inflammatory Responses in Vivo / J. Altomonte, L. Wu, L. Chen, [et al.] // Molecular Therapy. – 2008. – Vol. 16. – № 1. – P. 146-153. DOI: 10.1038/sj.mt.6300343.
108. Surendran, A. Fatty Acid Transport Protein Inhibition Sensitizes Breast and Ovarian Cancers to Oncolytic Virus Therapy via Lipid Modulation of the Tumor Microenvironment / A. Surendran, M. Jamalkhah, J. Poutou, [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14. – Article number: 1099459. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1099459.
109. Vähä-Koskela, M. Tumor Restrictions to Oncolytic Virus / M. Vähä-Koskela, A. Hinkkanen // Biomedicines. – 2014. – Vol. 2. – № 2. – P. 163-194. DOI: 10.3390/biomedicines2020163.

110. Naldini, A. Hypoxia Enhances the Antiviral Activity of Interferons / A. Naldini, F. Carraro, W.R. Fleischmann Jr., V. Bocci // *Journal of Interferon Research*. – 1993. – Vol. 13. – № 2. – P. 127-132. DOI: 10.1089/jir.1993.13.127.
111. Reyes, A. Contribution of Hypoxia Inducible Factor-1 During Viral Infections / A. Reyes, N. Corrales, N.M.S. Gálvez, [et al.] // *Virulence*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 1482-1500. DOI: 10.1080/21505594.2020.1836904.
112. Kottke, T. Oncolytic Virotherapy Induced CSDE1 Neo-Antigenesis Restricts VSV Replication But Can Be Targeted By Immunotherapy / T. Kottke, J. Tonne, L. Evgin, [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – Article number: 1930. DOI: 10.1038/s41467-021-22115-1.
113. Guo, A.X. The Role of CSDE1 in Translational Reprogramming and Human Diseases / A.X. Guo, J.J. Cui, L.Y. Wang, J.Y. Yin // *Cell Communication and Signaling*. – 2020. – Vol. 18. – № 1. – Article number: 14. DOI: 10.1186/s12964-019-0496-2.
114. Muscolini, M. SIRT1 Modulates the Sensitivity of Prostate Cancer Cells to Vesicular Stomatitis Virus Oncolysis / M. Muscolini, L. Castiello, E. Palermo, [et al.] // *Journal of Virology*. – 2019. – Vol. 93. – № 15. – Article number: e00626-19. DOI: 10.1128/JVI.00626-19.
115. Westcott, M.M. Interferon Beta and Interferon Alpha 2a Differentially Protect Head and Neck Cancer Cells from Vesicular Stomatitis Virus-Induced Oncolysis / M.M. Westcott, J. Liu, K. Rajani [et al.] // *Journal of Virology*. – 2015. – Vol. 89. – № 15. – P. 7944-7954. DOI: 10.1128/jvi.00757-15.
116. Paglino, J.C. Vesicular Stomatitis Virus Has Extensive Oncolytic Activity against Human Sarcomas: Rare Resistance Is Overcome by Blocking Interferon Pathways / J.C. Paglino, A.N. van den Pol // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85. – № 18. – P. 9346-9358. DOI: 10.1128/jvi.00723-11.
117. Escobar-Zarate, D. Overcoming cancer cell resistance to VSV oncolysis with JAK1/2 inhibitors / D. Escobar-Zarate, Y.-P. Liu, L. Suksanpaisan [et al.] // *Cancer Gene Therapy*. – 2013. – Vol. 20. – № 10. – P. 582-589. DOI: 10.1038/cgt.2013.55.
118. Cataldi, M. Breaking resistance of pancreatic cancer cells to an attenuated vesicular stomatitis virus through a novel activity of IKK inhibitor TPCA-1 / M. Cataldi, N.R. Shah,

- S.A. Felt, V.Z. Grdzlishvili // *Virology*. – 2015. – Vol. 485. – P. 340-354. DOI: 10.1016/j.virol.2015.08.003.
119. Dold, C. Application of Interferon Modulators to Overcome Partial Resistance of Human Ovarian Cancers to VSV-GP Oncolytic Viral Therapy / C. Dold, C. Rodriguez Urbiola, G. Wollmann, [et al.] // *Molecular Therapy Oncolytics*. – 2016. – Vol. 3. – Article number: 16021. DOI: 10.1038/mt.2016.21.
120. Geoffroy, K. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Alone or in Combination with JAK Inhibitors Is Effective Against Ovarian Cancer / K. Geoffroy, V. Mullins-Dansereau, K. Leclerc-Desaulniers, [et al.] // *Molecular Therapy Oncolytics*. – 2024. – Vol. 32. – № 3. – Article number: 200826. DOI: 10.1016/j.omton.2024.200826.
121. Shin, E.J. Interleukin-12 Expression Enhances Vesicular Stomatitis Virus Oncolytic Therapy in Murine Squamous Cell Carcinoma / E.J. Shin, G.B. Wana, B. Choi, [et al.] // *Laryngoscope*. – 2007. – Vol. 117. – № 2. – P. 210-214. DOI: 10.1097/01.mlg.0000246194.66295.d8.
122. Ireland, D.D. Interleukin (IL)-12 Receptor β 1 or IL-12 Receptor β 2 Deficiency in Mice Indicates That IL-12 and IL-23 Are Not Essential for Host Recovery From Viral Encephalitis / D.D. Ireland, B.M. Palian, C.S. Reiss // *Viral Immunology*. – 2005. – Vol. 18. – № 2. – P. 397-402. DOI: 10.1089/vim.2005.18.397.
123. Li, W. Overexpression of Smac by an Armed Vesicular Stomatitis Virus Overcomes Tumor Resistance / W. Li, R.C. Turaga, X. Li [et al.] // *Molecular Therapy - Oncolytics*. – 2019. – Vol. 14. – P. 188-195. DOI: 10.1016/j.omto.2019.05.006.
124. Liao, J.B. Single-Dose, Therapeutic Vaccination of Mice with Vesicular Stomatitis Virus Expressing Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein / J.B. Liao, J. Publicover, J.K. Rose, [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2008. – Vol. 15. – № 5. – P. 817-824. DOI: 10.1128/CVI.00343-07.
125. Kottke, T. Broad Antigenic Coverage Induced by Vaccination with Virus-Based cDNA Libraries Cures Established Tumors / T. Kottke, F. Errington, J. Pulido, [et al.] // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17. – № 7. – P. 854-859. DOI: 10.1038/nm.2390.

126. Pulido, J. Using Virally Expressed Melanoma cDNA Libraries to Identify Tumor-Associated Antigens That Cure Melanoma / J. Pulido, T. Kottke, J. Thompson, [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2012. – Vol. 30. – № 4. – P. 337-343. DOI: 10.1038/nbt.2157.
127. Cockle, J.V. Combination viroimmunotherapy with checkpoint inhibition to treat glioma, based on location-specific tumor profiling / J.V. Cockle, K. Rajani, S. Zaidi [et al.] // *Neuro-Oncology*. – 2015. – Vol. 18. – № 4. – P. 518-527. DOI: 10.1093/neuonc/nov173.
128. Shulak, L. Histone Deacetylase Inhibitors Potentiate Vesicular Stomatitis Virus Oncolysis in Prostate Cancer Cells by Modulating NF- κ B-Dependent Autophagy / L. Shulak, V. Beljanski, C. Chiang [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 5. – P. 2927-2940. DOI: 10.1128/jvi.03406-13.
129. Nguyễn, T.L.-A. Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis / T.L.-A. Nguyễn, H. Abdelbary, M. Arguello [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 39. – P. 14981-14986. DOI: 10.1073/pnas.0803988105.
130. Shen, W. Immunovirotherapy with Vesicular Stomatitis Virus and PD-L1 Blockade Enhances Therapeutic Outcome in Murine Acute Myeloid Leukemia / W. Shen, M.M. Patnaik, A. Ruiz, [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 127. – № 11. – P. 1449-1458. DOI: 10.1182/blood-2015-06-652503.
131. Wu, C. A Novel Oncolytic Virus Engineered with PD-L1 scFv Effectively Inhibits Tumor Growth in a Mouse Model / C. Wu, M. Wu, M. Liang, [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2019. – Vol. 16. – № 9. – P. 780-782. DOI: 10.1038/s41423-019-0264-7.
132. Sung, C.-K. Combined VSV Oncolytic Virus and Chemotherapy for Squamous Cell Carcinoma / C.-K. Sung, B. Choi, G. Wanna [et al.] // *The Laryngoscope*. – 2008. – Vol. 118. – № 2. – P. 237-242. DOI: 10.1097/MLG.0b013e3181581977.
133. Hastie, E. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus in an Immunocompetent Model of MUC1-Positive or MUC1-Null Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / E. Hastie, D.M.

- Besmer, N.R. Shah [et al.] // Journal of Virology. – 2013. – Vol. 87. – № 18. – P. 10283-10294. DOI: 10.1128/JVI.01412-13.
134. Alajez, N.M. Enhanced vesicular stomatitis virus (VSVΔ51) targeting of head and neck cancer in combination with radiation therapy or ZD6126 vascular disrupting agent / N.M. Alajez, J.D. Mocanu, T. Krushel [et al.] // Cancer Cell International. – 2012. – Vol. 12. – № 1. – P. 27. DOI: 10.1186/1475-2867-12-27.
135. Whitaker-Dowling, P. Vaccinia rescue of VSV from interferon-induced resistance: Reversal of translation block and inhibition of protein kinase activity / P. Whitaker-Dowling, J.S. Youngner // Virology. – 1983. – Vol. 131. – № 1. – P. 128-136. DOI: 10.1016/0042-6822(83)90539-1.
136. Le Boeuf, F. Synergistic Interaction Between Oncolytic Viruses Augments Tumor Killing / F. Le Boeuf, J.S. Diallo, J.A. McCart [et al.] // Molecular Therapy. – 2010. – Vol. 18. – № 5. – P. 888-895. DOI: 10.1038/mt.2010.44.
137. Gesundheit, B. Oncolytic Virotherapy for Metastatic Breast Cancer - A Case Report / B. Gesundheit, A. Muckenhuber, Y. Posen, [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2023. – Vol. 13. – Article number: 1186888. DOI: 10.3389/fonc.2023.1186888.
138. Forčić, D. An Unconventional Case Study of Neoadjuvant Oncolytic Virotherapy for Recurrent Breast Cancer / D. Forčić, K. Mršić, M. Perić-Balja, [et al.] // Vaccines (Basel). – 2024. – Vol. 12. – № 9. – Article number: 958. DOI: 10.3390/vaccines12090958.
139. Lin, J.Y. Viral and Host Proteins Involved in Picornavirus Life Cycle / J.Y. Lin, T.C. Chen, K.F. Weng, [et al.] // Journal of Biomedical Science. – 2009. – Vol. 16. – № 1. – Article number: 103. DOI: 10.1186/1423-0127-16-103.
140. Alekseeva, O.N. Receptors and Host Factors for Enterovirus Infection: Implications for Cancer Therapy / O.N. Alekseeva, L.T. Hoa, P.O. Vorobyev, [et al.] // Cancers (Basel). – 2024. – Vol. 16. – № 18. – Article number: 3139. DOI: 10.3390/cancers16183139.
141. Picornaviridae ~ ViralZone [сайт]. URL: <https://viralzone.expasy.org/33>. (Дата обращения: 28.09.2026).

142. Pond, A.R. Oncolytic Effect of Poliomyelitis Virus on Human Epidermoid Carcinoma (Hela Tumor) Heterologously Transplanted to Guinea Pigs / A.R. Pond, E.E. Manuelidis // *The American Journal of Pathology*. – 1964. – Vol. 45. – № 2. – P. 233-249.
143. Atsumi, S. Oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas using live attenuated poliovirus / S. Atsumi, A. Matsumine, H. Toyoda [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2012. – Vol. 41. – № 3. – P. 893-902. DOI: 10.3892/ijo.2012.1514.
144. Merrill, M.K. Poliovirus Receptor CD155-Targeted Oncolysis of Glioma / M.K. Merrill, G. Bernhardt, J.H. Sampson, [et al.] // *Neuro-Oncology*. – 2004. – Vol. 6. – № 3. – P. 208-217. DOI: 10.1215/S1152851703000577.
145. Dobrikova, E.Y. Recombinant Oncolytic Poliovirus Eliminates Glioma In Vivo Without Genetic Adaptation to a Pathogenic Phenotype / E.Y. Dobrikova, T. Broadt, J. Poiley-Nelson [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2008. – Vol. 16. – № 11. – P. 1865-1872. DOI: 10.1038/mt.2008.184.
146. Ochiai, H. Targeted Therapy for Glioblastoma Multiforme Neoplastic Meningitis with Intrathecal Delivery of an Oncolytic Recombinant Poliovirus / H. Ochiai, S.A. Campbell, G.E. Archer, [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12. – № 4. – P. 1349-1354. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1595.
147. Ochiai, H. Treatment of Intracerebral Neoplasia and Neoplastic Meningitis with Regional Delivery of Oncolytic Recombinant Poliovirus / H. Ochiai, S.A. Moore, G.E. Archer [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10. – № 14. – P. 4831-4838. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0694.
148. Holl, E.K. Recombinant Oncolytic Poliovirus, PVSRIPO, Has Potent Cytotoxic and Innate Inflammatory Effects, Mediating Therapy in Human Breast and Prostate Cancer Xenograft Models / E.K. Holl, M.C. Brown, D. Boczkowski, [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 48. – P. 79828-79841. DOI: 10.18632/oncotarget.12975.
149. Walton, R.W. Engineered Oncolytic Poliovirus PVSRIPO Subverts MDA5-Dependent Innate Immune Responses in Cancer Cells / R.W. Walton, M.C. Brown, M.T.

Sacco, [et al.] // Journal of Virology. – 2018. – Vol. 92. – № 19. – Article number: e00879-18. DOI: 10.1128/JVI.00879-18.

150. Dobrikova, E.Y. Attenuation of Neurovirulence, Biodistribution, and Shedding of a Poliovirus:Rhinovirus Chimera after Intrathalamic Inoculation in *Macaca fascicularis* / E.Y. Dobrikova, C. Goetz, R.W. Walters [et al.] // Journal of Virology. – 2012. – Vol. 86. – № 5. – P. 2750-2759. DOI: 10.1128/jvi.06427-11.

151. Desjardins, A. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus / A. Desjardins, M. Gromeier, J.E. Herndon II, [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 379. – № 2. – P. 150-161. DOI: 10.1056/NEJMoa1716435.

152. McGuigan, A. Pancreatic Cancer: A Review of Clinical Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Outcomes / A. McGuigan, P. Kelly, R.C. Turkington, [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2018. – Vol. 24. – № 43. – P. 4846-4861. DOI: 10.3748/wjg.v24.i43.4846.

153. Luu, T. Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Regulation Mechanisms in Pancreatic Cancer / T. Luu // Frontiers in Oncology. – 2021. – Vol. 11. – Article number: 646399. DOI: 10.3389/fonc.2021.646399.

154. Pan, G. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance / G. Pan, Y. Liu, L. Shang [et al.] // Cancer Communications. – 2021. – Vol. 41. – № 3. – P. 199-217. DOI: 10.1002/cac2.12138.

155. Funamizu, N. MicroRNA-200b and-301 Are Associated with Gemcitabine Response as Biomarkers in Pancreatic Carcinoma Cells / N. Funamizu, [et al.] // International Journal of Oncology. – 2019. – Vol. 54. – № 3. – P. 991-1000. DOI: 10.3892/ijo.2019.4676.

156. Jancík, S. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers / S. Jancík, J. Drábek, D. Radzioch, [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2010. – Article ID: 150960. DOI: 10.1155/2010/150960.

157. Mehra, S. Targeting PI3K Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Rationale and Progress / S. Mehra, N. Deshpande, N. Nagathihalli // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13. – № 17. – Article number: 4434. DOI: 10.3390/cancers13174434.

158. Kim, E.K. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases / E.K. Kim, E.-J. Choi // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2010. – Vol. 1802. – № 4. – P. 396-405. DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
159. Furukawa, T. Impacts of Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Pancreatic Cancer / T. Furukawa // *Frontiers in Oncology*. – 2015. – Vol. 5. – Article number: 23. DOI: 10.3389/fonc.2015.00023.
160. Polireddy, K. Cancer of the Pancreas: Molecular Pathways and Current Advancement in Treatment / K. Polireddy, Q. Chen // *Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 7. – № 11. – P. 1497-1514. DOI: 10.7150/jca.14922.
161. Tao, J. Targeting Hypoxic Tumor Microenvironment in Pancreatic Cancer / J. Tao, G. Yang, W. Zhou, [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2021. – Vol. 14. – № 1. – Article number: 14. DOI: 10.1186/s13045-020-01030-w.
162. Lambert, A. An Update on Treatment Options for Pancreatic Adenocarcinoma / A. Lambert, L. Schwarz, I. Borbath, [et al.] // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. – 2019. – Vol. 11. – Article number: 1758835919875568. DOI: 10.1177/1758835919875568.
163. Nisar, M. An Extensive Review on Preclinical and Clinical Trials of Oncolytic Viruses Therapy for Pancreatic Cancer / M. Nisar, R.Z. Paracha, S. Adil, [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – Article number: 875188. DOI: 10.3389/fonc.2022.875188.
164. McKinnon, C. Glioblastoma: Clinical Presentation, Diagnosis, and Management / C. McKinnon, M. Nandhabalan, S.A. Murray, P. Plaha // *BMJ*. – 2021. – Vol. 374. – Article number: n1560. DOI: 10.1136/bmj.n1560.
165. Wen, P.Y. Malignant Gliomas in Adults / P.Y. Wen, S. Kesari // *New England Journal of Medicine*. – 2008. – Vol. 359. – № 5. – P. 492-507. DOI: 10.1056/NEJMr0708126.
166. Louis, D.N. MOLECULAR PATHOLOGY OF MALIGNANT GLIOMAS / D.N. Louis // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2006. – Vol. 1. – № Volume 1, 2006. – P. 97-117. DOI: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100043.

167. Kleihues, P. Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis / P. Kleihues, H. Ohgaki // *Neuro-Oncology*. – 1999. – Vol. 1. – № 1. – P. 44-51. DOI: 10.1093/neuonc/1.1.44.
168. Hamad, A. Recent Developments in Glioblastoma Therapy: Oncolytic Viruses and Emerging Future Strategies / A. Hamad, G.M. Yusubalieva, V.P. Baklaushev, [et al.] // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – Article number: 547. DOI: 10.3390/v15020547.
169. Alifieris, C. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment / C. Alifieris, D.T. Trafalis // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2015. – Vol. 152. – P. 63-82. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.
170. Reed, L. J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / Reed, L. J. // *American Journal of Hygiene*. – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
171. Corbett, T.H. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice / T.H. Corbett, B.J. Roberts, W.R. Leopold [et al.] // *Cancer research*. – 1984. – Vol. 44. – № 2. – P. 717-726.
172. C57BL/6 Mice Datasheet | Charles River Available online: [сайт]. URL: <https://www.criver.com/products-services/find-model/c57bl6-mouse>. (Дата обращения: 03.05.2024).
173. Назаренко, А.С. Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов жёлтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластом и карцином поджелудочной железы / А.С. Назаренко, Ю.К. Бирюкова, Е.О. Орлова [и др.] // *Вопросы вирусологии*. – 2023. – Т. 68. – № 6. – С. 536–548. DOI: 10.36233/0507-4088-204.
174. Nazarenko, A.S. Immunotherapeutic Potential of the Yellow Fever Virus Vaccine Strain 17D for Intratumoral Therapy in a Murine Model of Pancreatic Cancer / A.S. Nazarenko, Y.K. Biryukova, K.N. Trachuk, [et al.] // *Vaccines (Basel)*. – 2025. – Vol. 13. – № 1. – Article number: 40. DOI: 10.3390/vaccines13010040.
175. Alishba, K. A Review Of PVSRIPO As a Treatment for Glioblastoma / K. Alishba // *International Journal of High School Research*. – 2023. – Vol. 5. – № 5.

176. Shah, S. Novel Therapies in Glioblastoma Treatment: Review of Glioblastoma; Current Treatment Options; and Novel Oncolytic Viral Therapies / S. Shah // Medical Sciences. – 2024. – Vol. 12. – № 1. – P. 1. DOI: 10.3390/medsci12010001.
177. Schubert, M. Primary structure of the vesicular stomatitis virus polymerase (L) gene: evidence for a high frequency of mutations / M. Schubert, G.G. Harmison, E. Meier // Journal of Virology. – 1984. – Vol. 51. – № 2. – P. 505-514. DOI: 10.1128/jvi.51.2.505-514.1984.
178. Lindquist, L. Tick-borne encephalitis / L. Lindquist, O. Vapalahti // The Lancet. – 2008. – Vol. 371. – № 9627. – P. 1861-1871. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4.
179. Newman, E.A. Update on neuroblastoma / E.A. Newman, S. Abdessalam, J.H. Aldrink [et al.] // Journal of Pediatric Surgery. – 2019. – Vol. 54. – № 3. – P. 383-389. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2018.09.004.
180. Corredor, J.C. N-Myc Expression Enhances the Oncolytic Effects of Vesicular Stomatitis Virus in Human Neuroblastoma Cells / J.C. Corredor, N. Redding, K. Bloté, [et al.] // Molecular Therapy Oncolytics. – 2016. – Vol. 3. – Article number: 16005. DOI: 10.1038/mto.2016.5.
181. Toyoda, H. Oncolytic Treatment and Cure of Neuroblastoma by a Novel Attenuated Poliovirus in a Novel Poliovirus-Susceptible Animal Model / H. Toyoda, J. Yin, S. Mueller [et al.] // Cancer Research. – 2007. – Vol. 67. – № 6. – P. 2857-2864. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3713.
182. Isaeva, A.S. Comparative analysis of oncolytic potential of vesicular stomatitis virus serotypes Indiana and New Jersey in cancer cell lines / A.S. Isaeva, N.O. Porozova, E. Idota [et al.] // Sechenov Medical Journal. – 2023. – Vol. 14. – № 4. – P. 17-30. DOI: 10.47093/2218-7332.2023.946.14.
183. Vazeh, H. Live-Attenuated Poliovirus-Induced Extrinsic Apoptosis Through Caspase 8 Within Breast Cancer Cell Lines Expressing CD155 / H. Vazeh, E. Behboudi, A. Hashemzadeh-Omran, A. Moradi // Breast Cancer. – 2022. – Vol. 29. – № 5. – P. 899-907. DOI: 10.1007/s12282-022-01372-y.

184. Herheliuk, T. Response of breast cancer cells to IFN α -2b in 2D and 3D cell cultures / T. Herheliuk, O. Perepelytsina, A. Ugnivenko [et al.] // Turkish Journal of Biology. – 2019. – Vol. 43. – No. 1. – P. 13–20. DOI: 10.3906/biy-1808-36.
185. Robinson, S. P. Inhibition of hormone-dependent and independent breast cancer cell growth in vivo and in vitro with the antiestrogen toremifene and recombinant human interferon-alpha 2 / S. P. Robinson, D. Goldstein, P. L. Witt [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 1990. – Vol. 15. – № 2. – P. 95–101. DOI: 10.1007/BF01810781.
186. Dodd, D. A. Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection / D. A. Dodd, T. H. Giddings Jr, K. Kirkegaard // Journal of Virology. – 2001. – Vol. 75. – No. 17. – P. 8158–8165. DOI: 10.1128/jvi.75.17.8158-8165.2001.
187. Huang, T.-G. Oncolysis of hepatic metastasis of colorectal cancer by recombinant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice / T.-G. Huang, O. Ebert, K. Shinozaki [et al.] // Molecular Therapy. – 2003. – Vol. 8. – № 3. – P. 434–440. DOI: 10.1016/S1525-0016(03)00204-1.
188. Соколова, Т. М. Активность генов системы интерферона в клетках аденокарциномы толстого кишечника НСТ-116: регуляция рекомбинантными интерферонами-альфа-2 из бактериальных и растительных продуцентов / Т. М. Соколова, Е. Н. Кособокова, А. Н. Шувалов [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12. – № 3. – С. 39–44.
189. Lei, H. AKT activation and response to interferon-beta in human cancer cells / H. Lei, P. J. Furlong, J. H. Ra [et al.] // Cancer Biology & Therapy. – 2005. – Vol. 4. – No. 7. – P. 709–715. DOI: 10.4161/cbt.4.7.1767.
190. Zhand, S. Oral Poliovirus Vaccine-Induced Programmed Cell Death Involves Both Intrinsic and Extrinsic Pathways in Human Colorectal Cancer Cells / S. Zhand, S.M. Hosseini, A. Tabarraei, [et al.] // Oncolytic Virotherapy. – 2018. – Vol. 7. – P. 95–105. DOI: 10.2147/OV.S177260.

191. Erickson, A. K. Dynamic viral dissemination in mice infected with yellow fever virus strain 17D / A. K. Erickson, J. K. Pfeiffer // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – No. 22. – P. 12392–12397. DOI: 10.1128/JVI.02149-13.
192. Weber, E. Type I interferon protects mice from fatal neurotropic infection with Langat virus by systemic and local antiviral responses / E. Weber, K. Finsterbusch, R. Lindquist [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – No. 21. – P. 12202–12212. DOI: 10.1128/JVI.01215-14.
193. Seto, D. N. A Key Role for Leukemia Inhibitory Factor in C26 Cancer Cachexia / D. N. Seto, S. C. Kandarian, R. W. Jackman // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 290. – No. 32. – P. 19976–19986. DOI: 10.1074/jbc.M115.638411.
194. Patel, M.R. Blood Outgrowth Endothelial Cells as a Cellular Carrier for Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Expressing Interferon- β in Preclinical Models of Non-Small Cell Lung Cancer / M.R. Patel, B.A. Jacobson, Y. Ji [et al.] // *Translational Oncology*. – 2020. – Vol. 13. – № 7. – P. 100782. DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100782.
195. Li, Q. Induction of Apoptosis and Tumor Regression by Vesicular Stomatitis Virus in the Presence of Gemcitabine in Lung Cancer / Q. Li, Y.Q. Wei, Y.J. Wen, [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2004. – Vol. 112. – № 1. – P. 143-149. DOI: 10.1002/ijc.20276.
196. Jindal, V. PVSRIPO Effect on Cancer / V. Jindal et al. // *SCIOL Genetic Sciences*. – 2018. – Vol. 1. – № 2. – P. 56.
197. Lebeau, G. The Efficient Antiviral Response of A549 Cells Is Enhanced When Mitochondrial Respiration Is Promoted / G. Lebeau, D. El Safadi, A. Paulo-Ramos [et al.] // *Pathogens*. – 2022. – Vol. 11. – No. 10. – P. 1168. DOI: 10.3390/pathogens11101168.
198. Shimada, K. Molecular mechanism underlying the antiproliferative effect of suppressor of cytokine signaling-1 in non-small-cell lung cancer cells / K. Shimada, S. Serada, M. Fujimoto [et al.] // *Cancer Science*. – 2013. – Vol. 104. – No. 11. – P. 1483–1491. DOI: 10.1111/cas.12266.
199. Miorin, L. Antagonism of type I interferon by flaviviruses / L. Miorin, A. M. Maestre, A. Fernandez-Sesma [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications. – 2017. – Vol. 492. – No. 4. – P. 587–596. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.146.
200. Felt, S.A. Induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by vesicular stomatitis virus / S.A. Felt, M.J. Moerdyk-Schauwecker, V.Z. Grdzlishvili // *Virology*. – 2015. – Vol. 474. – P. 163-173. DOI: 10.1016/j.virol.2014.10.026.
201. Goad, D.W. Intertumoral heterogeneity impacts oncolytic vesicular stomatitis virus efficacy in mouse pancreatic cancer cells / D.W. Goad, A.Y. Nesmelova, L.R. Yohe, V.Z. Grdzlishvili // *Journal of Virology*. – 2023. – Vol. 97. – № 9. – P. e01005-23. DOI: 10.1128/jvi.01005-23.
202. Woo, Y. Myxoma Virus Is Oncolytic for Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells / Y. Woo, K.J. Kelly, M.M. Stanford [et al.] // *Annals of Surgical Oncology*. – 2008. – Vol. 15. – № 8. – P. 2329-2335. DOI: 10.1245/s10434-008-9924-z.
203. Kasuya, H. Suitability of a US3-inactivated HSV mutant (L1BR1) as an oncolytic virus for pancreatic cancer therapy / H. Kasuya, Y. Nishiyama, S. Nomoto [et al.] // *Cancer Gene Therapy*. – 2007. – Vol. 14. – № 6. – P. 533-542. DOI: 10.1038/sj.cgt.7701049.
204. Buijs, P. Recombinant Immunomodulating Lentogenic or Mesogenic Oncolytic Newcastle Disease Virus for Treatment of Pancreatic Adenocarcinoma / P. Buijs, S. Van Nieuwkoop, V. Vaes [et al.] // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7. – № 6. – P. 2980-2998. DOI: 10.3390/v7062756.
205. Geisler, A. Oncolytic Coxsackievirus B3 Strain PD-H Is Effective Against a Broad Spectrum of Pancreatic Cancer Cell Lines and Induces a Growth Delay in Pancreatic KPC Cell Tumors In Vivo / A. Geisler, B. Dieringer, L. Elsner [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 20. – P. 11224. DOI: 10.3390/ijms252011224.
206. Awano, M. Measles Virus Selectively Blind to Signaling Lymphocyte Activity Molecule Has Oncolytic Efficacy Against Nectin-4-Expressing Pancreatic Cancer Cells / M. Awano, T. Fujiyuki, K. Shoji, [et al.] // *Cancer Science*. – 2016. – Vol. 107. – № 11. – P. 1647-1652. DOI: 10.1111/cas.13064.

207. Beck, A. Comparison of the Live Attenuated Yellow Fever Vaccine 17D-204 Strain to Its Virulent Parental Strain Asibi by Deep Sequencing / A. Beck, R.B. Tesh, T. G. Wood, [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*/ – 2014. – Vol. 209. – № 3. – P. 334-344. DOI: 10.1093/infdis/jit546.
208. Danthi, P. Enter the kill zone: initiation of death signaling during virus entry / P. Danthi // *Virology*. – 2011. – Vol. 411. – № 2. – P. 316–324. DOI: 10.1016/j.virol.2010.12.043.
209. Chistov, A.A. 5-(Perylen-3-Ylethynyl)Uracil as an Antiviral Scaffold: Potent Suppression of Enveloped Virus Reproduction by 3-Methyl Derivatives in Vitro / A.A. Chistov, S.P. Chumakov, I.E. Mikhnovets, [et al.] // *Antiviral Research*. – 2023. – Vol. 209. – Article number: 105508. DOI: 10.1016/j.antiviral.2022.105508.
210. Cramer, S.W. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma / S.W. Cramer, C.C. Chen // *Frontiers in Surgery*. – 2020. – Vol. 6. – Article number: 81. DOI: 10.3389/fsurg.2019.00081.
211. Neris, R.L.S. Co-protoporphyrin IX and Sn-protoporphyrin IX inactivate Zika, Chikungunya and other arboviruses by targeting the viral envelope / R.L.S. Neris, C.M. Figueiredo, L.M. Higa [et al.] // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8. – Art. 9805. DOI: 10.1038/s41598-018-27855-7.
212. Lebedeva, N.S. The Application of Porphyrins and Their Analogues for Inactivation of Viruses / N.S. Lebedeva, Y.A. Gubarev, M.O. Koifman, [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 19. – Article number: 4368. DOI: 10.3390/molecules25194368.
213. Bartusik-Aebisher, D. Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Brain Cancers—A Review / D. Bartusik-Aebisher, P. Woźnicki, K. Dynarowicz, [et al.] // *Brain Sciences*. – 2023. – Vol. 13. – № 9. – Article number: 1299. DOI: 10.3390/brainsci13091299.
214. Bates, R.C. Spheroids and cell survival / R.C. Bates, N.S. Edwards, J.D. Yates // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2000. – Vol. 36. – № 2. – P. 61-74. DOI: 10.1016/S1040-8428(00)00077-9.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Форма добровольного информированного согласия пациента на лечебную (диагностическую) манипуляцию (процедуру)

Приложение 7 к приказу МНИОИ им. П.А. Герцена - Филиал ФГБУ
"НМИЦ Радиологии" Минздрава России
От 19.08.2015 №105

Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена - филиал
Федерального Государственного Бюджетного Учреждения "Национальный Медицинский
Исследовательский Центр Радиологии" Министерства Здравоохранения Российской Федерации

**ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ ПАЦИЕНТА НА ЛЕЧЕБНУЮ
(ДИАГНОСТИЧЕСКУЮ) МАНИПУЛЯЦИЮ (ПРОЦЕДУРУ)**

V

(фамилия, имя, отчество)
находясь на лечении в отделении Поликлиника МНИОИ им. П.А. Герцена - Филиал ФГБУ
"НМИЦ Радиологии" Минздрава России
(наименование лечебно-профилактического учреждения)
уполномочиваю лечащего врача:
(фамилия, имени, отчества)
выполнить мне манипуляцию, процедуру (нужное подчеркнуть)
Молекулярно-биологическое исследование

Мне разъяснены и понятны суть моего заболевания и опасности, связанные с дальнейшим развитием этого заболевания.
Я понимаю необходимость проведения указанной манипуляции (процедуры).
Мне полностью ясно, что во время указанной манипуляции (процедуры) или после нее могут развиваться осложнения, что может потребовать дополнительных вмешательств (лечения).
Я уполномочиваю врачей выполнить любую процедуру или дополнительное вмешательство, которое может потребоваться в целях лечения, а также в связи с возникновением непредвиденных ситуаций.
Я удостоверяю, что текст моего информированного согласия на операцию мною прочитан, мне понятно назначение данного документа, полученные разъяснения понятны и меня удовлетворяют.

V

Пациент _____
(подпись пациента, либо его доверенного лица, ФИО, реквизиты документа, подтверждающего право представлять интересы пациента, дата)

Дата: « » 202 г.

(подпись лечащего врача, оперирующего врача, ФИО, дата)

www.msk-oncology.ru 810180114124