

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

ЗОНОВ ЕВГЕНИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

МЕХАНИЗМЫ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АПОПТИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ШТАММА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

Клеточная биология, цитология, гистология – 03.03.04

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор
Рябчикова Елена Ивановна

Новосибирск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
• Опухолевые заболевания и методы их лечения	11
• Новейшие методы лечения опухолевых заболеваний.....	15
• Онколитические вирусы.....	18
• Поксвирусы. Онколитические штаммы поксвирусов.....	28
• Апоптин – онкоселективный индуктор апоптоза.....	33
ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
• Клеточные линии и вирусы.....	39
• Животные и введение вируса.....	39
• Светооптические и иммуногистохимические исследования.....	41
• Электронно-микроскопические исследования	43
• Изучение изменений цитоскелета клеток карциномы A431 <i>in vivo</i>	44
• Статистический анализ.....	44
ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	46
Изменения клеток карциномы A431 человека, привитой мышам nude, вызванные репродукцией штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB.....	47
• Морфология опухолевых узлов карциномы A431 после интратуморального введения штаммов BOB.....	48
• Оценка репродукции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП BOB в ксенографтах карциномы A431.....	57
• Экспрессия апоптина в клетках карциномы A431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB	59
• Индукция апоптоза в клетках карциномы A431 при воздействии BOB.....	61
• Влияние апоптина на организацию микрофиламентов клеток карциномы A431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB.....	64

Механизмы противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ на сингенную карциному Эрлиха, привитую мышам.....	71
• Влияние введения ВОВ на морфологию опухолевых узлов карциномы Эрлиха.....	71
• Реакция клеток иммунной системы мышей С57В1 с солидной карциномой Эрлиха на интратуморальное введение ВОВ.....	75
• Изменения митотической активности опухолевых клеток после интратуморального введения ВОВ.....	80
• Морфологические характеристики асцитной карциномы Эрлиха.....	80
• Оценка уровня репликации штаммов ВОВ в клетках асцитной карциномы Эрлиха.....	82
• Влияние репликации ВОВ на клеточный цикл клеток асцитной карциномы Эрлиха.....	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
ВЫВОДЫ.....	95
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Онкологические заболевания в настоящее время являются одной из основных причин смертности в развитых странах. В 2012 году в мире было зарегистрировано более 14 миллионов новых случаев и более 8 миллионов случаев смерти от опухолевых заболеваний (World Cancer Report, 2014). Очевидно, что высокий уровень заболеваемости и смертности требует интенсивной работы по разработке новых способов лечения онкологических заболеваний и созданию противоопухолевых препаратов. Современные схемы лечения опухолевых заболеваний, применяемые в клинической практике, как правило, основаны на химиотерапевтическом воздействии на опухолевую ткань, которое дополняют такие методы как радиотерапия и хирургическое удаление опухолевых узлов. Ни одна из существующих схем не гарантирует полного излечения, итогом лечения онкологических заболеваний является продление жизни пациента на тот или иной период времени (D'Errico et al., 2017; Urruticoechea et al., 2010). Серьезной проблемой применения химиотерапевтических методов лечения опухолевых заболеваний являются побочные эффекты и, в первую очередь, - интоксикация организма. Побочные эффекты значительно осложняют лечение опухолевых заболеваний, так как организм пациента ослаблен вследствие развития опухоли и, часто, метастазов (Delaney et al., 2005; Staff et al., 2017).

Современные методы лечения опухолевых заболеваний, находящиеся на стадии разработки, направлены в первую очередь, на адресную доставку противоопухолевого агента в ткань опухоли, избирательное воздействие препарата на опухолевые клетки, а также на нивелирование побочных эффектов лечения. Перспективными подходами к лечению опухолевых заболеваний считаются иммунотерапия с использованием специфических для опухолевых клеток каждого пациента антител, увеличение селективности доставки противоопухолевых агентов в ткань опухоли с помощью наночастиц и виротерапия опухолевых заболеваний (Franks et al., 2012; Knepper et al., 2017).

Противоопухолевые свойства вирусов были обнаружены в первой половине XX века, когда впервые появились сообщения о случаях излечения больных раком при острых вирусных заболеваниях, в частности, при гриппе (Kelly et al., 2007). Вирусы, способные специфически уничтожать опухолевые клетки, получили название онколитических. Прорыв в области виротерапии опухолевых заболеваний произошел в начале 90-х годов XX века, одновременно с развитием генетической инженерии, позволившей изменять геном онколитических вирусов, в частности, получать рекомбинантные штаммы с заданными свойствами (Naik et al., 2009; Fukuhara et al., 2016). Геном онколитических вирусов изменяют, прежде всего, в направлении усиления их противоопухолевых свойств и снижения патогенности. Создание рекомбинантных онколитических штаммов вирусов является самостоятельной актуальной задачей современной генетической инженерии вирусов. Одним из способов получения рекомбинантных штаммов является введение в геном вируса трансгенов, кодирующих белки, усиливающие проникновение вируса в ткань опухоли, увеличивающие продолжительность нахождения вируса в опухоли, стимулирующие иммунный противоопухолевый ответ или индуцирующие апоптоз опухолевых клеток (Hulou et al., 2016). Именно индукция апоптоза, естественного пути гибели клеток, является наиболее предпочтительным механизмом уничтожения опухоли (Tavassoli et al., 2005).

Поиск проапоптотических белков и встройка генов, их кодирующих, в геном онколитических вирусов – одно из наиболее перспективных и активно разрабатываемых направлений создания современных высокоэффективных средств противоопухолевой терапии. Белок апоптин (неструктурный белок вируса анемии цыплят) способен избирательно индуцировать апоптоз опухолевых, но не нормальных клеток (Tavassoli et al., 2005; Los et al., 2009). В научной литературе описаны рекомбинантные апоптин-экспрессирующие штаммы онколитических вирусов, созданные на основе природных штаммов аденовируса, лентивируса, вируса болезни Ньюкасла, вируса оспы кур (Los et al., 2009). Вирус осповакцины (ВОВ), представитель семейства *Poxviridae*, обладает естественными противоопухолевыми свойствами и является хорошей

основой для создания эффективных рекомбинантных онколитических штаммов, благодаря своим природным свойствам. Так, известно, что ВОВ не интегрирует свои гены в геном хозяина, в свою очередь, его геном позволяет встроить около 20 тыс. пар нуклеотидов без снижения репродуктивных свойств вируса (Кочнева и др., 2013).

На основе штамма Л-ИВП ВОВ в ГНЦВБ «Вектор» был создан рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ, обладающий сниженными патогенными свойствами вследствие делеции гена *C11R*, на место которого был встроен искусственный ген, кодирующий апоптин. Штамм VVdGF-ApoS24/2 обладает повышенной литической активностью в отношении опухолевых клеток по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП *in vitro* (Кочнева и др., 2013). Анализ биологических свойств штамма VVdGF-ApoS24/2 говорит о перспективности его использования в качестве основы для создания противоопухолевого препарата, что определяет актуальность изучения его противоопухолевых свойств и механизмов онколитического действия *in vivo*.

Целью данной работы является изучение механизмов противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ на ксенографты карциномы А431 человека и мышиную карциному Эрлиха.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить морфологические характеристики репликации штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в опухолевых клетках ксенографтов карциномы А431 человека и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей.
2. Оценить морфологическими методами противоопухолевое действие штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ в сравнении с исходным штаммом Л-ИВП. Установить механизмы противоопухолевого действия штаммов на ксенографты карциномы А431 человека и трансплантаты карциномы Эрлиха мышей.

3. Изучить влияние штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ на процессы пролиферации и апоптоза клеток ксенографтов карциномы человека А431 и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей.

Научная новизна работы. В работе впервые изучены механизмы противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ на карциному человека А431 и сингенную опухоль мышей (карциному Эрлиха). Впервые описаны морфологические характеристики репликации штамма VVdGF-ApoS24/2 в клетках карциномы А431 человека, привитой иммунодефицитным мышам, и в клетках сингенной асцитной карциномы Эрлиха у иммунокомпетентных мышей, описана морфология ксенографтов и трансплантатов опухолей. Установлено усиление противоопухолевого эффекта рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП ВОВ, несмотря его на менее интенсивную репликацию.

Впервые показано, что апоптин, экспрессирующийся в составе генома штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ, не индуцирует процесс апоптотической гибели опухолевых клеток солидной карциномы человека и асцитной карциномы мышей *in vivo*. Впервые описано взаимодействие апоптина с элементами цитоскелета, приводящее к «мумификации» клеток ксенографтов карциномы человека А431, привитой мышам.

Впервые обнаружено существование еще одного механизма противоопухолевого действия онколитических вирусов, который реализуется на модели сингенной опухоли (карцинома Эрлиха), привитой мышам. Противоопухолевый эффект не был связан ни с прямым разрушением опухолевых клеток, ни с индукцией противоопухолевых иммунных реакций, ни с разрушением внутриопухолевых кровеносных сосудов. Введение апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ приводило к «аресту» клеточного цикла опухолевых клеток в S-фазе и последующему уменьшению объема опухолей. Количество клеток, «замерших» в S-фазе клеточного цикла

при введении штамма VVdGF-ApoS24/2, статистически значимо превышало таковое при введении исходного штамма Л-ИВП, что, несомненно, связано с экспрессией апоптина в составе генома рекомбинантного штамма.

Научно-практическая значимость исследования. Результаты данной работы существенно дополняют современные представления о механизмах противоопухолевого действия онколитических вирусов, в частности, апоптин-продуцирующих рекомбинантов, на примере штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. В работе показана принципиальная возможность получения выраженного терапевтического эффекта онколитического вируса без вовлечения эффекторных клеток иммунной системы, что имеет большое значение для создания противоопухолевых препаратов для больных с явлениями иммунодефицита. Представленные в работе новые данные о внутриклеточных взаимодействиях белка апоптина, могут быть использованы для создания новых эффективных противоопухолевых препаратов на основе онколитических вирусов. Все результаты работы имеют научно-практическое значение, и используются при создании новых рекомбинантных онколитических вирусов в ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России (Соглашение № 14.604.21.0057; идентификатор проекта RFMEFI60414X0057) и РФФИ (грант 13-04-01076).

Положения, выносимые на защиту:

1. Рекомбинантный штамм VVdGF-ApoS24/2 вируса осповакцины оказывает выраженный противоопухолевый эффект при однократном интратуморальном введении мышам с привитыми опухолевыми узлами человеческой и мышинной карциномы.
2. Противоопухолевый эффект рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 вируса осповакцины определяется действием апоптина, экспрессируемого в составе его генома, и природной способностью вируса к лизису опухолевых клеток.

3. Механизм противоопухолевого действия апоптина, экспрессируемого в составе генома рекомбинантного штамма вируса осповакцины, связан с его способностью индуцировать накопление филаментов цитоскелета и приводить к «аресту» клеточного цикла опухолевых клеток в S- фазе.

Апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах из перечня ВАК. Результаты работы были представлены на научных конференциях: «VI Всероссийский с международным участием конгресс молодых ученых-биологов Симбиоз-Россия-2013» (Иркутск, 2013), «Научная конференция молодых молекулярных биологов, вирусологов и биотехнологов OpenBio-2014» (Кольцово, 2014), «VIII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов Симбиоз-Россия-2015» (Новосибирск, 2015).

Основные публикации

1. Galina Kochneva, **Evgeniy Zonov**, Antonina Grazhdantseva, Anastasiya Yunusova, Galina Sibolobova, Evgeniy Popov, Oleg Taranov, Sergei Netesov, Peter Chumakov, Elena Ryabchikova. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression// *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5. - № 22. – С. 11269-82.
2. Юнусова А.Ю., **Зонов Е.В.**, Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И. Морфология ксенографтов карциномы А431 человека у мышей линии nude// *Вестник НГУ*. – 2014. – Том 12. – Выпуск 3. – С. 42-48.
3. **Evgeniy Zonov**, Galina Kochneva, Anastasiya Yunusova, Antonina Grazhdantseva, Vladimir Richter, Elena Ryabchikova. Features of the Antitumor Effect of Vaccinia Virus Lister Strain// *Viruses*. - 2016. –Vol. 8. - № 1.
4. **Зонов Е.В.**, Кочнева Г.В., Тупицына А.В., Рябчикова Е.И. Противоопухолевый эффект апоптин-продуцирующего

рекомбинантного штамма осповакцины *in vivo* связан с блокированием митотического деления опухолевых клеток// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. - № 4. - стр.154-159.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Опухолевые заболевания и методы их лечения

Онкологические (опухолевые) заболевания - обширная группа болезней, способных поражать любые ткани и органы человеческого организма. Основным отличительным свойством онкологических заболеваний является неконтролируемый рост опухолевых клеток (онкоцитов), которые распространяются по всему организму и образуют многочисленные «колонии». Процесс распространения опухолевых клеток по организму называется метастазированием и зачастую является непосредственной причиной смерти при опухолевых заболеваниях.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения опухолевые заболевания являются одной из основных причин смертности в развитых странах. В 2012 году в мире было зарегистрировано более 14 миллионов новых случаев заболевания и более 8 миллионов случаев смерти от опухолевых заболеваний (World Cancer Report, 2014). Распределение опухолевых заболеваний по половому признаку в человеческой популяции неоднородно. Среди мужчин чаще выявляются случаи заболевания раком легких, простаты, прямой кишки, желудка и печени. Женщины чаще болеют раком молочной железы, прямой кишки, легких, шейки матки и желудка (World Cancer Report, 2014). Основными факторами, увеличивающими вероятность развития опухолевых заболеваний, являются курение табака, употребление алкоголя, высокий индекс массы тела, низкая физическая активность, недостаток в рационе фруктов и овощей (World Cancer Report, 2014). Известно, что риск развития опухолевых заболеваний повышает заражение вирусами гепатита В (HBV) и С (HCV), вирусом папилломы человека (ВПЧ), а также вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) (World Cancer Report, 2014).

Исторически первым методом лечения опухолевых заболеваний являлось хирургическое вмешательство, оно же оставалось единственным вплоть до конца 19 века. Смысл хирургического вмешательства заключается в физическом

удалении опухолевой ткани, которое наиболее эффективно при лечении первичных опухолевых узлов на ранних стадиях заболевания, при условии, что первичный узел доступен для хирургического вмешательства. Хирургическое удаление опухоли применяют и в современной клинической практике, выживаемость после хирургического вмешательства составляет 30-40% в течение 5 лет. Для повышения эффективности и минимизации риска развития метастазов хирургическое удаление опухоли дополняют радио- или химиотерапевтическим лечением (Urruticoechea et al., 2010; D'Errico et al., 2017).

Открытие рентгеновских лучей и радиоактивности в конце XIX – начале XX века привело к изобретению метода радиотерапии опухолевых заболеваний. Суть метода заключается в направленном воздействии на опухолевый узел ионизирующего излучения. В настоящее время радиотерапия применяется в основном как преоперативная, вспомогательная или поддерживающая, с целью увеличить выживаемость пациентов с онкологическими заболеваниями после хирургического вмешательства. Для таких видов онкологических заболеваний, как опухоли тканей головы, шеи, рак предстательной железы и Ходжкинская лимфома, радиотерапия является основным методом лечения. Статистические данные свидетельствуют, что радиотерапию применяют в 45-50% случаев развития опухолевых заболеваний. Одной из причин столь широкого распространения радиотерапии является оптимальное соотношение стоимости и эффективности данного метода лечения (Urruticoechea et al., 2010; Delaney et al., 2005). Сочетание радиотерапии и хирургического вмешательства оставалось основным методом лечения опухолевых заболеваний вплоть до 60-х годов XX века. Эффективность такого подхода оставалась на довольно низком уровне: лечение приводило к полному выздоровлению лишь в 33% случаев, причиной чего являлось развитие метастазов (Urruticoechea et al., 2010; DeVita et al., 2008).

Принципиально новым методом лечения опухолевых заболеваний во второй половине XX века стала химиотерапия, то есть воздействие на опухолевые клетки химическими веществами с целью их уничтожения. Началом эры химиотерапии считают 40-е года XX века, когда велась активная разработка химического оружия массового поражения, которая и привела к

открытию противоопухолевых свойств азотистых аналогов иприта (производные бис- β -хлорэтиламина). Первый противоопухолевый препарат на его основе был создан в 1946 году. Позднее противоопухолевые свойства были обнаружены у актиномицина D, который изначально разрабатывали как антибиотик. В 1948 году доктор Фарбер с соавторами обнаружили противоопухолевую активность у аминоптерина и метотрексата, которые оказались наиболее эффективны при лейкемии у детей. Во второй половине 1940-х годов были открыты противоопухолевые свойства тиопуринов (Pippa et al., 2011; Morrison et al., 2010).

В 1960-х годах была сформирована концепция комбинированной химиотерапии (полихимиотерапии), которая заключается в одновременном применении нескольких химиотерапевтических препаратов. Одной из первых схем комбинированной химиотерапии, показавшей довольно высокую клиническую эффективность, была VAMP (vincristine, amethopterine, 6-mercaptopurine, prednisone). Применение схемы полихимиотерапии VAMP приводило к редукции опухолевого узла в 60% случаев, причем в половине из них наблюдалось полное излечение. Такие схемы полихимиотерапии, как MOMP (melphalan, methotrexate, vincristine, prednisone) и MOPP (melphalan, procarbazine, vincristine, prednisone) получили широкое распространение благодаря эффективности против Неходжкинских лимфом (DeVita et al., 2008; Morrison et al., 2010).

Большинство применявшихся в 1960 - 1980-х годах химиотерапевтических препаратов являются цитостатиками, их действие направлено, прежде всего, на остановку деления и уничтожение опухолевых клеток. К сожалению, действие цитостатических химиотерапевтических препаратов не ограничивается опухолевыми клетками, они оказывают токсическое действие на все клетки организма, что приводит к таким побочным эффектам как угнетение кроветворения, потеря волос, нарушения пищеварения и другие (DeVita et al., 2008; Pippa et al., 2011; Morrison et al., 2010).

Изучение опухолевых заболеваний в 1970-1980 г.г. способствовало пониманию процессов роста и развития опухоли, что позволило исследователям

создать теории "Убийство клетки" Скиппера (1964), «Математическая модель роста опухоли» Нортон и Саймона (1976), «Модель роста опухоли» Голди и Колдмана (1979) и "Правило Худшего Лекарства Дэя" (1986). Продолжались попытки улучшения имеющихся методов и схем лечения онкологических заболеваний (DeVita et al., 2008; Morrison et al., 2010; Galmarini et al., 2012).

Развитие биологических наук привело к появлению в 1990-е годы концепции таргетной или направленной противоопухолевой терапии, основная идея которой заключается в избирательном воздействии на опухолевые клетки-мишени и максимальном избегании воздействия на здоровые клетки организма. Первым таргетным препаратом стал иманитиба мезилаг (одобрен для широкого применения в 1996 г.), который является ингибитором гибридной тирозинкиназы, характерной для клеток миелолейкозов различных типов (Morrison et al., 2010; Hunter et al., 2011). Один из самых распространенных таргетных препаратов - ритуксимаб, созданный на основе моноклональных антител к белку CD-20, который присутствует на поверхности малигнизированных В-лимфоцитов. В клинической практике ритуксимаб применяют как индивидуально, так и в комплексе с цитостатическими препаратами, что значительно повышает эффективность лечения В-клеточной Неходжкинской лимфомы (DeVita et al., 2008; Morrison et al., 2010).

В процессе развития методов лечения онкологических заболеваний, от хирургического вмешательства до таргетной терапии, четко прослеживается тенденция к подбору уникальной схемы лечения для каждого конкретного случая. В зависимости от происхождения опухоли, стадии заболевания, возраста, состояния здоровья пациента и других факторов, применяют различные комбинации существующих методов лечения опухолевых заболеваний, варьируют дозы химиотерапевтических препаратов, дозы облучения при радиотерапии и многие другие параметры лечения (Urruticoechea et al., 2010; Galmarini et al., 2012; D'Errico et al., 2017).

Новейшие методы лечения опухолевых заболеваний

В настоящее время поиск новых эффективных подходов для лечения опухолевых заболеваний продолжается, одним из многообещающих методов считается иммунотерапия – применение препаратов, стимулирующих иммунную систему к борьбе с опухолевыми клетками. Полагают, что иммунная система обладает способностью к уничтожению опухолевых клеток и предотвращению опухолевых заболеваний (Franks et al., 2012; Seledtsov et al., 2015; Кнеpper et al., 2017). Преимуществом иммунотерапии является отсутствие большей части побочных эффектов, возникающих при химиотерапевтическом лечении. Большой интерес исследователей вызывает подход, основанный на активации дендритных клеток, которые являются ключевым звеном в развитии иммунного ответа. Активация дендритных клеток приводит к повышению продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, ускоренному созреванию и повышению активности Т-киллеров. Активацию дендритных клеток проводят *ex vivo* и *in vivo*. Первой официально зарегистрированной схемой терапии опухолевых заболеваний на основе дендритных клеток является Сипулецил-Т. В клинических испытаниях лечение неоперабельного рака простаты Сипулецилом-Т приводило к увеличению общей выживаемости на 10%, эти показатели сохранялись в течение 3-х лет после лечения (Banchereau et al., 1998; Brignone et al., 2007; Franks et al., 2012).

Подход, основанный на активации Т-клеточного иммунитета, также рассматривается как потенциально перспективный для внедрения в клиническую практику. Известно, что основными регуляторами активности Т-лимфоцитов являются пептиды CTLA-4 и PD-1, их инактивация приводит к значительному повышению активности Т-лимфоцитов в отношении опухолевых клеток. Первым зарегистрированным противоопухолевым препаратом, действующим по этому пути, является ипилимумаб (Ipilimumab), который, по существу, является анти-CTLA-4 антителами. Наибольшую эффективность ипилимумаб показал против рака простаты, рака легких, опухолевых заболеваний крови (Brunet et al., 1987; Franks et al., 2012).

Менее распространены такие методы иммунотерапии опухолевых заболеваний как адоптивный перенос Т-клеток, вакцинация опухолевыми антигенами (белки, пептиды, нуклеиновые кислоты), активация иммунитета органическими наночастицами. Предпринимаются попытки сочетания методов иммунотерапии с различными химиотерапевтическими препаратами и онколитическими вирусами. На данный момент иммунотерапевтические методы лечения опухолевых заболеваний только начинают применять в клинической практике. Ожидается, что в последующие годы интерес к иммунотерапии будет возрастать, и количество различных методов лечения будет увеличиваться (Sheen et al., 2014; Knepper et al., 2017).

С развитием нанотехнологий, в частности, методов синтеза различных наночастиц, исследователи предпринимали попытки применять их для лечения опухолевых заболеваний. Основное предназначение наночастиц в области лечения опухолей - использование их в качестве векторов для доставки противоопухолевых агентов непосредственно в опухолевые узлы или опухолевые клетки. В качестве противоопухолевых средств могут быть использованы химиотерапевтические препараты и их прекурсоры, нуклеиновые кислоты, обладающие противоопухолевой активностью (Chen, 2010; Fang et al., 2012; Gozuacik et al., 2014).

Наночастицы подразделяют на органические (липидные, полимерные, вирусоподобные) и неорганические, в том числе на основе золота, оксида железа или кремния. Липидные наночастицы наиболее распространены вследствие простоты синтеза и представляют собой полые сферы, в которых помещаются молекулы противоопухолевого агента (Fang et al, 2012; Zhu, Liao, 2015). Уже зарегистрированы несколько препаратов на основе липидных наночастиц, несущих в себе химиотерапевтические препараты: Доксил (Doxil), Миоцет (Myocet), ДауноКсом (DaunoXome) (Chen, 2010; Rosenthal et al., 2002; Jacquin et al., 2012; Markman, 2006).

Полимерные наночастицы чаще выступают в качестве ядра, которое несёт на своей поверхности молекулы противоопухолевого агента. Молекулы полимера и препарата образуют комплекс преимущественно за счёт

гидрофобных связей. На данный момент клинические испытания проходят такие препараты на основе полимерных наночастиц как Ксиотакс (Xyotax) и СТ-2106 (PGA-camptotecin) (Bhatt et al., 2003; Sabbatini et al., 2004; Chen, 2010; Fang et al., 2014).

Вирусоподобные наночастицы создают с целью повысить специфичность доставки химиотерапевтического агента в опухоль, непосредственно к опухолевым клеткам. Специфичность достигается за счет наличия на поверхности вирусоподобных наночастиц молекул, обладающих аффинностью к рецепторам опухолевых клеток. Примером таких рецепторов являются трансферриновые рецепторы, которые в большом количестве представлены на поверхности опухолевых клеток (Chen, 2010).

Некоторые наночастицы обладают уникальными оптическими или электромагнитными свойствами, что позволяет применять их как "наноскальпели", которые уничтожают опухолевые клетки изнутри. Это возможно, в частности, благодаря способности ряда наночастиц разогреваться под действием лазерного облучения или переменного магнитного поля (Gozuacik et al., 2014).

Для доставки противоопухолевых агентов непосредственно в ткань опухоли предлагают также использовать стволовые клетки. Было обнаружено, что мезенхимальные и нервные стволовые клетки склонны к миграции в первичные опухолевые узлы и метастазы (Aboody et al., 2000; Song et al., 2009). Модифицированные стволовые клетки "нагружают" противоопухолевыми агентами и вводят в организм пациента. В случае опухолей центральной нервной системы такой подход может быть очень эффективен, так как опухоли головного и спинного мозга часто труднодоступны для хирургического вмешательства, а наличие гемато-энцефалического и ликворного барьера затрудняет доставку противоопухолевых агентов с током крови (Ciavarella et al., 2011; Karshieva et al., 2013).

Онколитические вирусы

С середины XVII века начали появляться сообщения о случаях регрессии гематологических опухолей (лейкемии, лимфомы), на фоне естественной вирусной инфекции. В 1896 году Док (Dock) описал ремиссию миелоидного лейкоза у пациентки, перенесшей грипп. Известен случай регрессии лейкемии у четырехлетнего мальчика после заражения вирусом ветряной оспы, причем, как утверждается, пациент не получал никакого противоопухолевого лечения до заражения оспой. Эти случаи считаются первыми, документально подтвержденными, фактами проявления вирусами противоопухолевых свойств. Впоследствии вирусы, способные уничтожать опухолевые клетки, активно в них размножаясь, получили название «онколитические вирусы» (Bierman et al., 1953; Kelly et al., 2007).

Лабораторные исследования противоопухолевых свойств вирусов начались в 50-х годах XX века. В качестве противоопухолевых агентов изначально рассматривали вирусы человека, так как усовершенствование методов противоопухолевой терапии было направлено, прежде всего, на лечение опухолевых заболеваний у людей (Kelly et al., 2007).

Первым вирусом, который применяли для противоопухолевой терапии, является вирус гепатита В (сем. *Hepadnaviridae*). После введения пациентам с Ходжкинской лимфомой сыворотки или экстракта тканей, содержащих вирус гепатита В, у 7 из 22 человек наблюдали улучшение общего состояния, у 4 человек наблюдали уменьшение размера опухоли. В числе побочных эффектов онкотерапии вирусом гепатита В наблюдались лихорадка и общее недомогание, зафиксирован один случай смерти (Still et al., 1987; Kelly et al., 2007).

Исследования противоопухолевой активности вируса Западного Нила (сем. *Flaviviridae*), опубликованные в 1952 году, оказали большое влияние на развитие противоопухолевой виротерапии, несмотря на то, что противоопухолевый эффект вируса был отмечен в небольшом числе случаев, большинство больных, получавших противоопухолевую терапию вирусом

Западного Нила, заболевали энцефалитом, было зафиксировано 2 случая смерти (Southam et al., 1951; Kelly et al., 2007).

Вирус АРС (сем. *Adenoviridae*) показал более многообещающие результаты в клинических исследованиях в 1956 году, по сравнению с вирусами гепатита В и Западного Нила. Введение вируса АРС пациентам с раком шейки матки приводило к развитию обширного некроза опухолевой ткани в течение 10 дней. Эффект наблюдали у двух третей пациентов, тем не менее, более половины пациентов, участвовавших в исследовании, скончались от рака. Наиболее вероятной причиной этому является реакция иммунной системы пациентов на введение аденовируса (Huebner et al., 1955; Kelly et al., 2010).

В России также ведутся разработки противоопухолевых препаратов на основе онколитических вирусов. В ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» был сконструирован мутантный вариант Ade12 аденовируса человека серотипа 5, у которого был удален ген белка E1 В. Полученный вирус эффективно разрушал раковые клетки, не затрагивая нормальные клетки человека. На основе этого штамма был создан противораковый препарат канцеролизин. Доклиническое изучение препарата на лабораторных животных (мыши, кролики, морские свинки) показало его безвредность и безопасность (Вдовиченко и др., 2006). Препарат «канцеролизин» прошел первую фазу клинических испытаний в 2008-2010 гг. в Онкологическом центре РАМН в Москве (Нетесов и др., 2011).

Аттенуированный (убитый, ослабленный) вирус паротита (сем. *Paramyxoviridae*) изначально применяли как иммуностимулирующий препарат у больных метастазирующей меланомой, которые плохо реагировали на стандартную схему лечения. Введение вируса паротита приводило к усилению регрессии опухоли. «Живой» неаттенуированный вирус паротита использовали в Японии в 1974 году для лечения широкого круга опухолевых заболеваний. В клинических испытаниях вирус показал довольно хорошие результаты: у 37 из 90 человек наблюдали полную регрессию опухоли или уменьшение размеров опухолевого узла более чем наполовину, причем введение неаттенуированного

вируса паротита не приводило к развитию серьезных побочных эффектов (Minton, 1973; Kelly et al., 2010).

Проблема побочных эффектов при виротерапии опухолевых заболеваний очень важна, так как иммунитет пациентов с опухолевыми заболеваниями, как правило, ослаблен. Введение вируса в ослабленный организм может привести к развитию вирусной инфекции, и, в конечном итоге, к летальному исходу. Существует два наиболее распространенных способа избежать развития побочных эффектов при виротерапии опухолевых заболеваний: использовать вирусы животных, непатогенные для человека, или искусственно изменить свойства человеческого вируса с целью снизить патогенные и усилить противоопухолевые свойства (Kelly et al., 2010; Clarke et al., 2015). Использование вирусов животных с целью излечения человека от опухолевых заболеваний позволяет не только избежать инактивации вирусных частиц, но и минимизировать вероятность развития вирусного заболевания в организме пациента (Kelly et al., 2010).

Первыми вирусами животных, которые было предложено использовать в качестве онколитических, были герпесвирус лошадей и вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. В 1960-х гг. исследователи обратили внимание на противоопухолевые свойства вируса гриппа птиц (сем. *Orthomyxoviridae*). Введение данного вируса мышам с привитой саркомой приводило к снижению размеров опухолей, но вирус быстро проникал в головной мозг, что приводило к гибели мышей (Southam, Moore, 1953). Еще один вирус птиц, который привлек внимание исследователей, благодаря наличию онколитических свойств, - вирус болезни Ньюкасла (сем. *Paramyxoviridae*). Внутрибрюшинное введение вируса болезни Ньюкасла мышам с асцитной карциномой Эрлиха оказалось эффективным и приводило к снижению объема опухоли. В настоящее время вирус болезни Ньюкасла считается безопасным для людей и используется за рубежом в качестве противоопухолевого препарата, в ряде случаев рецидивы опухоли отсутствовали в течение 10 лет после лечения (Moore, 1949; Moore, 1954; Pol et al., 2014).

Механизм противоопухолевого действия вируса болезни Ньюкасла достаточно хорошо изучен. Ведущую роль в этом процессе играет способность вируса болезни Ньюкасла инициировать в клетках опухоли апоптоз, одновременно запуская процесс апоптоза по внешнему и по внутреннему пути. Для этого необходимы проникновение вируса внутрь клетки, репликация вирусной РНК и синтез вирусных белков *de-novo*, только после этого происходит активация каспазы-8 и каспазы-9. Также известно, что вирус болезни Ньюкасла способен стимулировать противоопухолевые иммунные реакции, в основном противоопухолевую активность натуральных киллеров (Fábián et al., 2001; Elankumaran et al., 2006; Pol et al., 2014).

Идея искусственного изменения генома онколитических вирусов с целью снижения патогенности и усиления противоопухолевых свойств пользовалась большой популярностью с самого начала. К сожалению, в 50 – 60-х годах XX века методы генетической инженерии были недостаточно развиты и не позволяли целенаправленно изменить свойства вируса на уровне генома. Поэтому исследователи пытались изменить свойства онколитических вирусов в нужном направлении различными и порой весьма изощренными способами (Kelly et al., 2010).

Так, для снижения патогенности онколитических вирусов применяли метод вирусной интерференции. Подход базировался на предположении, что введение в организм пациента непатогенного вируса (интерферирующего агента) снижает вероятность развития вирусной инфекции после введения основного онколитического вируса. В эксперименте на мышах с опухолью нервной системы в качестве интерферирующего агента в мозг мышей вводили вирус болезни Ньюкасла. В качестве основного онколитического вируса выступал вирус западного Нила. Эксперимент подтвердил эффективность вирусной интерференции в области лечения опухолей центральной нервной системы. Однако, широкого распространения этот метод не получил (Speir, Southam, 1960).

В начале 1950 гг. Мур (Moore) высказал предположение, что последовательные пассажи вируса, обладающего онколитическими свойствами,

на культуре опухолевых клеток могут привести к значительному усилению его противоопухолевых свойств по отношению к данной линии клеток. Эксперименты с вирусом энцефалита, который прошел 20-30 пассажей на культуре клеток саркомы 180, подтвердили это предположение. Таким образом, было использовано природное свойство вирусов адаптироваться к репликации в определенном типе клеток (Moore, 1952).

Несмотря на очевидный прогресс в области виротерапии опухолей, в 70 - 80-х годах XX века наблюдался спад интереса к онколитическим вирусам и, как следствие, резкое уменьшение количества работ, посвященных изучению онколитических вирусов и механизмов их действия. Одной из основных причин этого спада являлось недостаточное развитие методов молекулярной биологии и генной инженерии по сравнению с современным уровнем, что послужило причиной застоя в этой области (Kelly et al., 2010).

В начале 1990-х годов развитие молекулярной биологии, генетики и биотехнологии позволило осуществлять направленное изменение вирусного генома, что открыло путь к созданию онколитического вируса с требуемыми свойствами – рекомбинантного онколитического вируса (Russel et al., 2008; Zeyuallah et al., 2012). Первым таким вирусом стал вирус простого герпеса, из генома которого был удален ген, кодирующий тимидин-киназу (ТК). Тимидин-киназа – фермент, необходимый для репликации ДНК, который в большом количестве присутствует в активно делящихся клетках, таких как недифференцированные стволовые клетки крови и опухолевые клетки. В неделящихся дифференцированных клетках ген ТК инактивирован за ненадобностью. Удаление гена ТК из генома вируса простого герпеса привело к невозможности репликации вируса в неделящихся дифференцированных клетках, тем самым значительно снизив патогенность вируса. Эффективность рекомбинантного вируса простого герпеса была показана в эксперименте на мышях с привитой злокачественной глиомой: интрацеребральное введение рекомбинантного вируса простого герпеса привело к полному исчезновению опухоли (Jamieson, 1974; Moolten et al., 1990; Martuza et al., 1991). Наряду с вирусом простого герпеса генетические модификации проводили с

представителями таких семейств вирусов как аденовирусы, пикорнавирусы, парамиксовирусы и поксвирусы. Прежде всего, модификации генома проводили с целью повысить безопасность вируса для пациента и специфичность вируса по отношению к опухолевым клеткам, а также усилить противоопухолевую активность рекомбинантного вируса.

Современные онколитические вирусы, как правило, отличаются от своих природных предшественников наличием модификаций генома или химических модификаций поверхности вирусной частицы. Все модификации онколитических вирусов направлены на повышение эффективности вируса как противоопухолевого препарата. Существует множество различных модификаций, но механизмы их действия направлены на достижение одной цели: уничтожение всех опухолевых клеток в организме пациента без ущерба для неопухолевых и организма в целом (Kelly et al., 2010).

Модификации поверхности онколитических вирусов в основном направлены на повышение эффективности доставки вируса к опухолевым клеткам. Это необходимо при системном введении вирусных частиц в кровоток, которое применяют с целью распространения вируса по всему организму для борьбы с метастазами. Попадая в ток крови, вирусные частицы быстро покрываются различными белками плазмы (опсонизируются): антителами, компонентами системы комплемента, факторами коагуляции и другими, что приводит к «узнаванию» вируса макрофагами, в том числе клетками Купфера, и незамедлительной инактивации вируса. Для того, чтобы увеличить время свободного нахождения вируса в кровотоке и, соответственно, повысить вероятность попадания его в опухолевую ткань применяют методы химической модификации поверхности вирусных частиц с помощью биосовместимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ) и гидроксипропил-метаакриламид (ГПМА) (Eto et al., 2008; Fisher, Seymour, 2010). В экспериментах было показано, что частицы аденовируса, покрытые ПЭГ, выводятся из кровотока в четыре раза медленнее по сравнению с непокрытыми частицами. Еще одним способом увеличить время нахождения онколитического

вируса в кровотоке является предварительная обработка вируса компонентами яда кобры или циклофосфамидом (Ikeda, 1999; Ikeda, 2000; Wakimoto, 2002).

Генетические модификации вирусов направлены на усиление их противоопухолевых свойств с помощью самых разнообразных способов. Один из них – усиление проникновения частиц онколитического вируса в опухолевую ткань. Известно, что кровеносные сосуды в ткани опухоли значительно отличаются от нормальных сосудов, в их эндотелии присутствуют межклеточные «бреши» размером 200-900 нм, в то время как размер аналогичных «брешей» в эндотелии «нормальных» кровеносных сосудов составляет всего 2-6 нм (Kelly et al., 2010). Наличие брешей в эндотелии внутриопухолевых сосудов способствует проникновению в опухолевую ткань макромолекул, вирусных частиц и наночастиц. Было показано, что рекомбинантный вирус кори, экспрессирующий белок-фрагмент активатора плазминогена урокиназы, обладает повышенным сродством к клеткам эндотелия внутриопухолевых кровеносных сосудов по сравнению с немодифицированным вирусом кори, что усиливает его проникновение в ткань опухоли через стенку кровеносных сосудов (Hobbs, 1998; Hashizume, 2000). Усилить проникновение онколитических вирусов в ткань опухоли также возможно с помощью введения в организм пациента интерлейкина-2 (ИЛ-2), фактора некроза опухолей- α (ТНФ- α), гистамина или аналогов брадикинина (Barnett, 1999; Fang et al., 2011).

Направленная модификация генома онколитических вирусов позволяет ограничить репликацию онколитического вируса исключительно опухолевыми клетками, иными словами снизить патогенность вируса. Это достигается путем мутации, инактивации или физического удаления из вирусного генома одного или нескольких так называемых генов вирулентности (Kelly et al., 2010).

Одним из первых генов вирулентности, удаление которого привело к аттенуации онколитических вирусов, является ген, кодирующий тимидинкиназу. Вирус простого герпеса, из генома которого искусственно удалили ген *UL23*, кодирующий ТК, способен размножаться только в активно делящихся клетках млекопитающих и в опухолевых клетках. В дифференцированных

клетках, в которых ТК отсутствует, рекомбинантный штамм *dlsptk* простого герпеса практически не размножается (Zeh, Bartlett, 2002).

Делеция гена *UL39* в геноме вируса простого герпеса приводила к эффекту, схожему с делецией гена *UL23*. Продуктом гена *UL23* является фермент нуклеотид-редуктаза, который непосредственно участвует в синтезе дезоксирибонуклеотидов, что критически важно для репликации вирусного генома. Искусственное удаление гена *UL39* приводит к существенному снижению интенсивности репликации вируса в неделящихся клетках, тогда как в опухолевых клетках репликация рекомбинантного вируса простого герпеса сохраняется на прежнем уровне по сравнению с исходным немодифицированным вирусом (Dufour et al., 2011).

Рекомбинантный штамм аденовируса ONYX-015 отличается от исходного штамма аденовируса искусственной делецией гена, кодирующего белок E1B. Белок E1B обладает способностью ингибировать активность проапоптотического белка p53, который является одним из ключевых белков-регуляторов запуска процесса апоптоза. Известно, что в большинстве опухолевых клеток ген белка p53 не экспрессируется, что является одной из причин, по которым в опухолевых клетках различного происхождения апоптоз не запускается. Рекомбинантный штамм аденовируса ONYX-015 не способен реплицироваться в нормальных клетках, в которых есть белок p53, но активно экспрессируется в опухолевых клетках, что неизбежно приводит к их гибели. ONYX-015 является первым онколитическим вирусом, который был испытан на пациентах с онкологическими заболеваниями в 15 клинических испытаниях. По итогам испытаний от онкологических заболеваний излечились более 200 пациентов (Rothmann et al., 1998; Russel et al., 2008; Uusi-Kerttula et al., 2015).

Искусственная мутация в участке генома вируса болезни Ньюкасла, кодирующем V-белок (*V protein*), привела к тому, что вирус потерял способность размножаться в нормальных клетках, а также в опухолевых клетках, обладающих нормально функционирующими интерферонами. Интерфероны – белки, обеспечивающие клеточную защитную реакцию при вирусной инфекции. Мутация гена, кодирующего V-белок, по существу привела

к аттенуации вируса болезни Ньюкасла. В экспериментах с применением линий опухолевых клеток, не обладающих нормальной системой внутриклеточного «иммунитета», рекомбинантный вирус болезни Ньюкасла с мутацией гена, кодирующего V-белок, оказывал более выраженный противоопухолевый эффект *in vivo* и *in vitro*, чем исходный вирус (Russel et al., 2008; Kelly, Russell, 2009).

Усиление распространения онколитического вируса от одной опухолевой клетки к другой позволяет увеличить скорость разрушения опухолевой ткани. Такой механизм усиления противоопухолевых свойств вирусов был реализован на примере вируса болезни Ньюкасла. Ген вируса, кодирующий белок F, был подвергнут искусственной мутации. Полученный в результате мутантный белок обладал способностью стимулировать слияние клеточных мембран, что увеличивало скорость распространения рекомбинантного штамма rNDV/F3aa вируса болезни Ньюкасла в ткани опухоли. В экспериментах заражение клеток штаммом rNDV/F3aa вируса болезни Ньюкасла приводило к образованию синцитиев из опухолевых клеток различных типов, что значительно ускорило процесс гибели опухолевых клеток под влиянием штамма rNDV/F3aa вируса болезни Ньюкасла. Встройка в геном рекомбинантного штамма rNDV/F3aa вируса болезни Ньюкасла гена вируса гриппа А, кодирующего белок NS1, антагонист интерферона млекопитающих, позволила получить мощный онколитический штамм вируса без выраженных патогенных свойств. Двойной рекомбинантный штамм вируса болезни Ньюкасла оказался гораздо эффективнее, чем исходный штамм rNDV/F3aa (Ebert et al., 2004; Lamb, 2007; Zamarin, Palese, 2012).

Стимуляция иммунитета для борьбы с опухолевыми заболеваниями считается перспективным подходом в области экспериментальной онкологии. В качестве агента, индуцирующего иммунный противоопухолевый ответ, могут служить рекомбинантные онколитические вирусы. Рекомбинантный штамм ONCOS-102 аденовируса был создан на основе штамма ORCA-010 путем встройки в его геном гена, кодирующего гранулоцитарно-моноцитарный-колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ). Исходный штамм аденовируса ORCA-010 характеризуется наличием встройки нуклеотида аденина в позиции

445 в гене *E3/19K*, что привело к значительному усилению репликации вируса в клетках и, соответственно, к усилению его противоопухолевых свойств. Таким образом, механизм противоопухолевого действия штамма ONCOS-102 складывается из прямого лизиса опухолевых клеток и выраженного противоопухолевого иммуностимулирующего действия (Russel et al., 2008; Naik, Russell, 2009; Vassilev et al., 2015; Fukuhara et al., 2016).

В опубликованной литературе описаны несколько рекомбинантных онколитических штаммов, стимулирующих противоопухолевый иммунный ответ, созданных на основе вируса болезни Ньюкасла. Эти штаммы отличались от исходных штаммов встройками в геном, благодаря которым в зараженной клетке синтезировались такие цитокины как ГМ-КСФ, интерферон- γ (ИФН- γ), интерлейкин-2 (ИЛ-2) и фактор некроза опухолей-2 (ФНО-2). У мышей с привитыми опухолями, после введения рекомбинантных цитокин-продуцирующих штаммов вируса болезни Ньюкасла происходило более выраженное снижение объема опухолевых узлов. Более того, мыши, у которых наблюдалась полная регрессия опухоли, впоследствии демонстрировали иммунные реакции против развивающихся опухолей. Установлено, что рекомбинантные цитокин-продуцирующие вирусы болезни Ньюкасла усиливали активность CD8- и CD4-лейкоцитов в ткани опухолевых узлов, стимулировали Т-клетки на борьбу с опухолевыми клетками и продукцию ИФН- γ лимфоцитами (Zamarin, Palese, 2012; Janke et al., 2007; Richards, Macdonald, 2011; Wilden et al., 2009; Schirmacher et al., 2000; Vigil et al., 2007).

Аденовирус, вирус болезни Ньюкасла и вирус простого герпеса не являются единственными вирусами, которые подверглись модификации генома с целью усилить их противоопухолевые свойства. Значительное количество работ, посвященных конструированию рекомбинантных онколитических вирусов, было выполнено с использованием штаммов вируса осповакцины, представителя семейства поксвирусов (сем. *Poxviridae*).

Поксвирусы. Онколитические штаммы поксвирусов

Поксвирусы (*Poxviridae*) - семейство вирусов животных, отличающихся крупными (до 300 нм) размерами и сложным строением вирионов. Геном поксвирусов, представленный двуцепочечной ДНК размером в среднем 250 тысяч пар оснований, может содержать в себе свыше 300 генов, кодирующих вирусные белки. Вирионы поксвирусов имеют овальную или кирпичеобразную форму и состоят из нуклеоида, содержащего вирусную ДНК, и латеральных телец, окружены двойной липидной мембраной, покрытой поверхностными белками. Примечательно, что помимо вирусной ДНК, частицы поксвирусов содержат в себе белки, необходимые для начала экспрессии генов и синтеза вирусных белков: ДНК- и РНК-полимеразы, ранние факторы транскрипции. Это позволяет поксвирусам начать репликацию ДНК практически сразу же после проникновения вириона в клетку. Важно, что представители семейства поксвирусов размножаются в специфических структурах, расположенных в цитоплазме клетки – вирусных фабриках, и никогда не интегрируют свой геном в геном клетки-хозяина (Вирусология в 3-х томах под ред. Филдса, Найпа, 1989; Маренникова, Щелкунов, 1998; Chan, McFadden, 2014).

Известны две инфекционные формы поксвирусов: внутриклеточные зрелые вирионы и внеклеточные «одетые» вирионы. Внутриклеточный зрелый вирус имеет одну, собственную, липидную оболочку. Такие вирионы выходят из клетки в момент разрушения её клеточной мембраны и заражают соседние клетки. Внеклеточный «одетый» вирус представляет собой частицы поксвируса, обернутые дополнительной мембраной, которая формируется из мембранных пузырьков транс-стороны аппарата Гольджи. Считается, что «одетая» форма поксвирусов служит для системного распространения вируса по организму. Дополнительная внешняя мембрана придает частицам поксвируса особые антигенные свойства и делает их «невидимыми» для иммунной системы организма хозяина. Экспериментально было показано, что антитела, полученные после иммунизации внутриклеточной «неодетой» формой вируса, не препятствуют заражению животных и культур клеток «одетой» формой вируса. Причиной этого является тот факт, что дополнительная мембрана

внеклеточной формы поксвирусов является «родной» для клеток иммунной системы хозяина. Относительные количества «одетой» формы поксвирусов составляют от 1 до 30% от общего количества вирионов в зависимости от штамма вируса и типа клеток, в которых вирус размножается (McFadden, 2005; Chan, McFadden, 2014).

Установлено, что поксвирусы способны проникать в цитоплазму большинства типов клеток млекопитающих, но факт проникновения вирусной частицы в клетку не обязательно влечет за собой размножения вируса. Размножение в зараженной клетке зависит от штамма вируса и от многих биохимических особенностей зараженной клетки (Chan, McFadden, 2014).

В семейство поксвирусов входят возбудители оспы позвоночных, такие как вирус оспы кур, вирусы оспы коров, мышей, обезьян, вирус контагиозного моллюска, вирус осповакцины, вирус натуральной оспы, а также вирусы оспы насекомых (Вирусология в 3-х томах, под ред. Филдса, Найпа, 1989).

Одним из наиболее известных и хорошо изученных представителей семейства поксвирусов является вирус осповакцины (ВОВ), который принадлежит к роду ортопоксвирусов (род *Orthopoxviridae*). ВОВ известен, прежде всего, тем, что его штаммы использовали для вакцинации против натуральной оспы, тяжелого высококонтагиозного заболевания человека. Достоверных данных относительно происхождения ВОВ нет (Вирусология в 3-х томах, под ред. Филдса, Найпа, 1989; Маренникова, Щелкунов, 1998).

Штамм ВОВ Листер входит в число наиболее распространенных в научных исследованиях штаммов. Считается, что штамм Листер ВОВ был получен в Кёльне (Германия) от солдата, переболевшего натуральной оспой, который был дополнительно привит от натуральной оспы лабораторным штаммом ВОВ. Позднее штамм Листер был распространен по лабораториям всего мира, в том числе и в СССР. Штамм Л-ИВП (Листер - Институт Вирусных Препаратов) ВОВ является одним из вариантов штамма Листер. В 1960 - 1970-х годах штамм Л-ИВП применяли на территории СССР для вакцинации населения в рамках программы по искоренению натуральной оспы (Fenner et al., 1988).

После многих лет использования штаммов ВОВ в качестве вакцины против вируса натуральной оспы было предложено использовать ВОВ в качестве онколитического вируса. Было обнаружено, что ВОВ хорошо подходит для создания на его основе эффективных противоопухолевых штаммов: он обладает природными противоопухолевыми свойствами, имеет широкий тропизм к клеткам млекопитающих различных типов, что означает универсальность ВОВ в отношении опухолей различного происхождения. ВОВ никогда не интегрирует свой геном в геном хозяина, соответственно, после введения ВОВ в организм, риск возникновения мутаций минимален; внеклеточная «одетая» форма ВОВ системно распространяется по организму, что важно для борьбы с труднодоступными опухолевыми узлами и метастазами. Наконец, показано, что в геном ВОВ можно встроить до 25 тысяч пар оснований без потери инфекционности вируса, что предоставляет большие возможности для модифицирования генома ВОВ (Smith, Moss, 1983; Moss, 2006; Kim, 2015).

В последние два десятилетия на основе различных штаммов ВОВ, в том числе штамма Л-ИВП, было создано большое количество рекомбинантных противоопухолевых штаммов. Наиболее часто в научной литературе встречаются работы, посвященные изучению противоопухолевых свойств рекомбинантного штамма GLV-1h68 ВОВ. Этот штамм был создан на основе штамма Л-ИВП путем искусственного удаления генов, кодирующих тимидинкиназу и гемагглютинин, и встройки генов, кодирующих GFP (Green fluorescent protein), β -галактозидазу и β -глюкоронидазу. В экспериментах рекомбинантный штамм GLV-1h68 ВОВ вводили интратуморально (внутри опухоли) или внутривенно мышам с привитыми ксенографтами человеческих опухолей. Опубликованные результаты свидетельствуют о значительном уменьшении размеров опухолевых узлов, избирательной репликации рекомбинантного штамма GLV-1h68 ВОВ в опухолевых клетках и об активации иммунной системы мышей. Таким образом, удаление генов, кодирующих тимидин-киназу и гемагглютинин, привело к высокой селективности штамма

GLV-1h68 BOB в отношении клеток ксенографтов опухолей человека, привитых мышам (Yu et al., 2009; He et al., 2012; Gentshev et al., 2012; Donat et al., 2012).

Другой рекомбинантный штамм (JX-549) BOB был создан на основе штамма Wyeth. В его геноме был искусственно удален ген, кодирующий тимидин-киназу и встроены гены, кодирующие ГМ-КСФ и β -галактозидазу. Штамм JX-549 BOB вводили внутривенно или интратуморально грызунам с привитыми ксенографтами опухолей человека, а также заражали опухолевые клетки *in vitro*. Были описаны повреждения внутриопухолевых сосудов, увеличение продолжительности жизни, улучшение общего состояния животных с привитыми ксенографтами опухолей человека после введения рекомбинантного штамма JX-549 BOB. Была показана селективность штамма JX-549 BOB в отношении опухолевых клеток *in vivo* и *in vitro*. Но, одновременно с этими положительными изменениями, после введения штамма JX-549 BOB наблюдали очаги некроза и инфильтрацию нейтрофилами, макрофагами, В- и Т-клетками в ткани головного мозга крыс с привитыми ксенографтами опухоли человека, (Breitbach et al., 2013; Lun et al., 2010; Parato et al., 2012).

Рекомбинантный штамм VVdd BOB, созданный на основе штамма Western Reserved BOB, отличается от исходного штамма отсутствием генов, кодирующих тимидин-киназу и VGF (vaccinia growth factor – вирусный фактор роста), на их место был встроен ген, кодирующий GFP. Секретируемый белок VGF является вирусным аналогом белка EGF (epidermal growth factor – фактор роста эпидермиса), он стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток, тем самым, обеспечивая выходящий из зараженной клетки вирус «субстратом» для дальнейшего размножения (Buller et al., 1988). Штамм VVdd BOB внутривенно вводили мышам с привитой опухолью в комплексе с трихостатином А, ингибитором деацетилазы гистонов. Было показано, что рекомбинантный штамм VVdd BOB способен размножаться в клетках, устойчивых к заражению исходным штаммом Western Reserved BOB. На модели легочных метастазов была продемонстрирована не только селективность штамма VVdd BOB в отношении опухолевых клеток, но и его способность затормаживать рост

опухолевых узлов и метастазов у мышей с привитой опухолью при комплексном введении с трихостатином А (Buller et al., 1988; MacTavish et al., 2010).

Несмотря на очевидные успехи в создании рекомбинантных онколитических вирусов на основе различных штаммов ВОВ, нельзя не отметить, что в большинстве опубликованных работ использован ограниченный набор методов изучения противоопухолевого эффекта рекомбинантных штаммов ВОВ. Так, в подавляющем большинстве работ противоопухолевое действие рекомбинантных штаммов ВОВ оценивают лишь по размерам опухолевых узлов, уменьшение которых служит основанием для заключения о «высокой эффективности» изучаемого вируса. Несомненно, это важный параметр, но не единственный, который следует учитывать при изучении противоопухолевых свойств рекомбинантных вирусов. Однако, в большей части опубликованных исследований отсутствует даже обзорное гистологическое исследование, не говоря об электронно-микроскопическом. Между тем, уменьшение размеров опухоли может быть обусловлено различными механизмами, которые могут быть выявлены с помощью методов микроскопического анализа.

Локализацию вирусных частиц в ткани опухоли, как правило, определяют непрямыми методами, основываясь лишь на данных о флуоресценции таких белков, как GFP, которые экспрессируются в составе генома рекомбинантных штаммов ВОВ. Такой способ определения локализации вирусных частиц имеет низкую чувствительность по сравнению с вирусологическими и микроскопическими методами исследования (иммуногистохимические реакции, прямая визуализация вируса в электронном микроскопе). Прежде всего, регистрация флуоресценции рекомбинантного вируса не позволяет оценить уровень его репродукции и определить точную локализацию вирусных частиц, что необходимо для оценки селективности рекомбинантного онколитического вируса.

Работы, посвященные изучению противоопухолевых свойств рекомбинантных штаммов ВОВ, в геном которых встроены гены, продукты экспрессии которых напрямую уничтожали бы опухолевые клетки, например, такие, как апоптоз-индуцирующие белки, единичны. Хорошо известно, что многие опухолевые клетки имеют нарушения работы генов, кодирующих белки, участвующие в «своевременном» запуске апоптоза, обеспечивающего элиминацию малигнизированных клеток. Такие нарушения являются одной из причин «бессмертия» опухолевых клеток. Запустить в клетке программу апоптоза можно было бы с помощью доставки в клетку проапоптотического белка. Использование рекомбинантных ВОВ в качестве вектора для доставки проапоптотических белков является перспективным подходом в области противоопухолевой виротерапии.

Апоптин – онкоселективный индуктор апоптоза

Апоптин – неструктурный белок вируса анемии цыплят, который способен избирательно индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, не затрагивая «нормальные» клетки млекопитающих. Вирус анемии цыплят – представитель семейства Цирковировусов (сем. *Circoviridae*), небольших ДНК-содержащих вирусов, который поражает недавно вылупившихся цыплят (в период до 2-х недель), затем цыплята приобретают резистентность к вирусу. Основными клетками-мишенями для вируса анемии цыплят являются недифференцированные клетки костного мозга и предшественники Т-клеток. Снижение числа эритропоэтических клеток и мегакариоцитов после заражения вирусом приводит к развитию анемии и тромбоцитопении и, впоследствии, к гибели цыплят (Tavassoli et al., 2005; Los et al., 2009; Zhou et al., 2012).

Апоптин состоит из 121 аминокислоты и не имеет гомологов среди всех известных белков. Механизм апоптоз-индуцирующего действия апоптина полностью не установлен, как и механизм его избирательности в отношении опухолевых клеток. Показано, что апоптин запускает процесс апоптоза по p53-независимому пути, что чрезвычайно важно, так как в большинстве опухолевых клеток проапоптотический белок p53 неактивен. Установлено, что в клетке

апоптин постоянно циркулирует между ядром и цитоплазмой, причем ядерная локализация необходима для запуска апоптоза. Транспорт внутрь ядра обеспечивается благодаря наличию особой последовательности аминокислот, которая располагается в позиции 97 - 105 аминокислотной последовательности апоптина (Noteborn et al., 1991; Danen-Van Oorschot et al., 1997; Danen-Van Oorschot et al., 2003). В ядре апоптин присоединяется к нативной ДНК, преимущественно в области гетерохроматина. Оказывает ли взаимодействие апоптина с ДНК влияние на экспрессию генов, точно не известно. Установлено, что в ядре клетки апоптин взаимодействует с белком PML, который входит в состав особых белковых ядерных телец. Белки, находящиеся в составе этих телец, участвуют в регуляции фундаментальных клеточных процессов, таких как репликация и репарация ДНК, транскрипция, апоптоз. Известно, что апоптин в клетке индуцирует выход цитохрома С из митохондрий и активацию эффекторных каспаз. Предполагаемым передатчиком «сигнала» апоптина из ядра клетки к митохондриям является фосфорилированная форма белка Nur77. Показано, что ингибирование синтеза белка Nur77 с помощью РНК-интерференции препятствует проапоптотическому действию апоптина (Noteborn et al., 1991; Leliveld et al., 2003; Leliveld et al., 2003).

Очевидно, что необычная способность апоптина избирательно индуцировать апоптоз в опухолевых клетках не могла не привлечь внимания ученых, работающих над проблемой создания эффективных противоопухолевых препаратов. Стимуляция гибели опухолевых клеток путем апоптоза имеет ряд преимуществ по сравнению с другими механизмами уничтожения опухолевых клеток. Апоптоз является естественным клеточным процессом и не сопровождается воспалением тканей и интоксикацией организма, которые неизбежно возникают при некротической гибели опухолевых клеток. Индукция апоптоза, несомненно, является наиболее перспективным вариантом противоопухолевого действия препаратов, особенно, - с учетом того, что химио- и радиотерапия всегда сопровождаются выбросом в кровь пациента большого количества токсинов. В последние годы наблюдается

тенденция к уходу от таких устаревших методов лечения к более современным и безопасным (Noteborn et al., 1991; Los et al., 2009; Zhou et al., 2012).

Несомненно, важно, что апоптин проявляет противоопухолевое действие в естественных условиях. Так, вирус саркомы Рауса часто вызывает развитие злокачественных опухолей у кур. Размножение вируса анемии цыплят в ткани опухолей, индуцированных вирусом саркомы Рауса, приводит к значительному уменьшению размера опухолевых узлов, которое является следствием продукции белка апоптина при репликации вируса анемии цыплят (Noteborn et al., 1991; Natesan et al., 2006).

Ген белка апоптина использовали в качестве трансгена для создания новых штаммов онколитических вирусов с целью получить новый эффективный противоопухолевый штамм вируса. Противоопухолевые свойства рекомбинантных апоптин-продуцирующих штаммов аденовируса изучали на клетках опухоли мочевого пузыря и желудка *in vitro* и *in vivo*. На культурах опухолевых клеток апоптин-продуцирующие штаммы аденовируса оказывали выраженное цитопатическое действие. Введение апоптин-продуцирующих штаммов аденовируса мышам с привитыми опухолями мочевого пузыря или желудка приводило к снижению размеров опухолевых узлов и увеличению продолжительности жизни мышей по сравнению с мышами контрольных групп. Результаты исследования показали, что репликация апоптин-продуцирующих штаммов аденовируса приводила к запуску апоптоза исключительно в опухолевых клетках. Авторы работы отмечают наличие изменений экспрессии опухоль-ассоциированных белков в клетках после заражения апоптин-продуцирующим штаммом аденовируса, блокирование клеточного цикла в G2/M-фазе, активацию эффекторных каспаз (Teodoro et al., 2003; Wang et al., 2013; Li et al., 2013).

Противоопухолевые свойства апоптин-экспрессирующего рекомбинантного штамма на основе лентивирусного вектора изучали на культурах опухолевых клеток и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Результаты исследования показали, что максимальная экспрессия апоптина наблюдалась в опухолевых клетках. В стволовых клетках костного

мозга экспрессия апоптина была на уровне, близком к нулю. Введение рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма лентивируса мышам с ксенографтами опухолевых клеток человека приводило к замедлению роста опухолевых узлов и развитию очагов некроза опухолевой ткани (Ye et al., 2013).

Рекомбинантный апоптин-продуцирующий вирус болезни Ньюкасла rFMW/AP был синтезирован и описан группой исследователей под руководством Ву (Wu). Опубликованные данные свидетельствуют, что рекомбинантный штамм rFMW/AP оказывает более интенсивное противоопухолевое действие *in vitro* по сравнению с исходным штаммом вируса болезни Ньюкасла. Введение рекомбинантного штамма rFMW/AP вируса болезни Ньюкасла мышам с привитыми ксенографтами опухолевых клеток человека также показало его преимущества по сравнению с исходным штаммом (Wu et al., 2012).

Встройка гена, кодирующего апоптин, в геном вируса оспы кур, члена семейства поксвирусов, позволила значительно усилить противоопухолевые свойства исходного штамма. Экспрессия апоптина в клетках гепатомы человека, зараженных рекомбинантным штаммом VVdd вируса оспы кур *in vitro* привела к увеличению количества клеток гепатомы в состоянии апоптоза в 8-9 раз по сравнению с клетками, зараженными исходным штаммом вируса оспы кур. Введение рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdd мышам с привитой сингенной гепатомой приводило к замедлению роста первичных узлов гепатомы и увеличению продолжительности жизни мышей по сравнению с мышами, получавшими инъекции исходного штамма вируса оспы кур (Li et al., 2006).

Таким образом, опубликованные данные свидетельствуют об усилении противоопухолевого действия онколитических вирусов при встройке в их геном гена апоптина, и авторы связывают этот эффект с усилением частоты апоптоза опухолевых клеток, однако, детальных сведений о механизмах проапоптотического действия рекомбинантов не приводят.

Рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 BOB был синтезирован в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Российская

Федерация) в 2013 году на основе штамма Л-ИВП ВОВ. Штамм VVdGF-ApoS24/2 аттенуирован, в его геноме искусственно удален ген *C11R*, кодирующий белок VGF, связанный с вирулентностью ВОВ. На место гена *C11R* был встроены синтетический ген, кодирующий белок апоптин. Важно, что в С-концевой области апоптина присутствует антигенный эпитоп «FLAG», для которого имеются коммерческие антитела (Серпинский и др., 2006; Кочнева и др., 2013). Такая модификация позволяет зафиксировать экспрессию белка апоптина иммунологическими методами анализа. Наличие в С-концевой области апоптина дополнительной аминокислотной последовательности «FLAG» не влияет на его способность запускать процесс апоптоза в опухолевых клетках. Изучение онкоселективности штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ и его противоопухолевых свойств на культурах опухолевых и нетрансформированных клеток показало, что рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ обладает гораздо большей литической активностью в отношении опухолевых клеток, чем исходный штамм Л-ИВП ВОВ. Литическая активность штамма VVdGF-ApoS24/2 в отношении нормальных клеток не отличалась от таковой у исходного штамма Л-ИВП ВОВ, что свидетельствует о значительном вкладе белка апоптина в онколитическое действие рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 (Кочнева и др., 2013).

В совокупности результаты исследований говорят о том, что рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ может послужить основой для создания эффективного противоопухолевого препарата. На культурах клеток было продемонстрировано его цитолитическое действие в отношении опухолевых клеток, но не в отношении нормальных нетрансформированных клеток.

Очевидно, что эксперименты по изучению противоопухолевой активности онколитических вирусов на культурах клеток не могут дать полного представления об особенностях взаимодействия вируса и опухолевых клеток. Первым шагом для внедрения штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ в качестве противоопухолевого агента в клиническую практику должно стать изучение его противоопухолевой активности и механизмов противоопухолевого действия на

лабораторных животных с привитыми опухолями различного происхождения. В таких экспериментах могут быть получены данные о распространении онколитического штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB в организме, особенностях его взаимодействия с иммунной системой организма, данные о механизмах его противоопухолевого действия. Четкое представление этих процессов чрезвычайно важно для создания эффективного противоопухолевого препарата на основе рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и вирусы

Клетки эпидермоидной карциномы A431 человека и фибробласты почек обезьян CV-1 были получены из ATCC (Маннасас, Вирджиния, США). Клетки культивировали при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в среде DMEM, с 10% содержанием фетальной бычьей сыворотки и антибиотиками (пенициллин-стрептомицин).

Штамм Л-ИВП ВОВ был получен из Государственной Коллекции возбудителей вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия). Рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ был получен вставкой искусственного гена, кодирующего неструктурный белок вируса анемии цыплят апоптин в геном штамма Л-ИВП ВОВ. Вставка гена апоптина замещает основную часть гена ВОВ *C11R*, кодирующего белок VGF (вирусный фактор роста). Введение гена, кодирующего апоптин, в геном штамма Л-ИВП было описано ранее (Кочнева и др. 2013). Вирус нарабатывали в клетках линии CV-1 и выделяли осаждением в градиенте сахарозы. Титр вируса определяли методом бляшек на монослое клеток CV-1, окрашенном фиксирующим раствором кристаллического фиолетового (2 г/л кристаллический фиолетовый, 50 мл/л формальдегид, 100 мл/л этанол, вода). Титр выражали в числе бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл суспензии. Вирус хранили в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия при -80°C, препарат имел концентрацию 10⁹ БОЕ/мл.

Животные и введение вируса

Для моделирования процесса роста опухоли человека были использованы самки мышей линии nude, полученные из филиала Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова НПП «Питомника лабораторных животных» (Московская область, г. Пушкино). Животных содержали в боксированных помещениях с дополнительной

филтрацией и стерилизацией воздуха. В работе использовали самок в возрасте 8-10 недель и массой 20-26 г.

Для инициации роста опухоли мышам подкожно в левое бедро вводили клетки карциномы А431 человека в количестве 5×10^6 клеток на мышь в 100 мкл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия. В экспериментах с карциномой А431 было использовано 108 мышей. Рост ксенографта ежедневно контролировали визуально. Через 10 сут после введения клеток мышам, у которых развились опухолевые узлы размером 175–211 мм³, однократно интратуморально вводили рекомбинантный штамм VVdGF-ApoS24/2 BOB в дозе 2×10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия. В качестве группы сравнения использовали мышей, в ксенографты которых однократно вводили исходный штамм Л-ИВП BOB в аналогичных дозе и объеме. Группу контроля составляли мыши с ксенорафтами, которым интратуморально вводили 100 мкл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. Рост опухолевых узлов фиксировали, измеряя длину и ширину, объем узлов определяли по формуле [длина×ширина²×0,5] (Yu et al., 2009). Мышей выводили из экспериментов через 2, 4, 8, 36 и 55 сут после введения BOB, иссекали опухолевые узлы с окружающими тканями и фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на растворе Хенкса для светооптического и ультраструктурного исследований.

Для получения узлов сингенной опухоли самцам мышей линии С57В1 (22-25 г) в правое бедро подкожно вводили 13×10^6 клеток мышинной карциномы Эрлиха в 0,4 мл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. Ежедневно мышей осматривали, отмечая рост опухоли. В данной серии экспериментов было использовано 57 мышей. Через 7 сут после подкожного введения клеток мышам в сформировавшуюся опухоль однократно вводили BOB VVdGF-ApoS24/2 в дозе 1×10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. Мыши группы сравнения получали однократные интратуморальные инъекции штамма Л-ИВП в дозе 1×10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. Мышам контрольной группы вводили 100 мкл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. Мышей ежедневно осматривали,

измеряли и вычисляли объем опухолевых узлов как описано выше. Животных содержали на стандартном рационе и при свободном доступе к воде.

Мышей выводили из экспериментов через 2, 4, 6, 8, 12 и 14 сут после введения ВОВ, иссекали опухолевые узлы и фиксировали в 4% растворе параформальдегида для светооптического и ультраструктурного исследований.

Для получения асцитной формы сингенной опухоли самкам мышей линии С57В1 весом 22-25 г интраперитонеально вводили $3-3,5 \times 10^6$ клеток карциномы Эрлиха в 0,2 мл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. В даноой серии экспериментов было использовано 39 животных. Через 4 сут мышам интраперитонеально вводили штамм VVdGF-ApoS24/2 в дозе $1,6 \times 10^7$ БОЕ/мышь в 100 мкл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия; мышам группы сравнения вводили штамм Л-ИВП ВОВ в аналогичных дозе и объеме. Группу контроля составляли мыши, получавшие однократное интраперитонеальное введение 100 мкл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. Животных содержали на стандартном рационе и при свободном доступе к воде.

Мышей выводили из экспериментов через 3, 6, 9 и 10 сут после введения вируса, отбирали асцитическую жидкость, опухолевые клетки осаждали центрифугированием (5 мин при 10 тыс. оборотов), трижды промывали 0,9% раствором хлорида натрия и фиксировали в 4% растворе параформальдегида для светооптического и ультраструктурного исследований.

Все исследования на животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755)

Светооптические и иммуногистохимические исследования.

Для светооптического исследования образцы (кусочки опухолевых узлов и осадки асцитической жидкости) обезвоживали стандартным способом в серии растворов этанола нарастающей концентрации, изопропанолу и ксилолу с помощью аппарата для гистологической проводки Sakura Tissue-Tek II (Sakura, Япония) и заливали в парафиновые блоки. С блоков изготавливали

парафиновые срезы толщиной 3,5 – 4 мкм. Для рутинного светооптического исследования срезы монтировали на обезжиренные предметные стекла, окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином и заключали под покровное стекло в среду Bio-Mount (Bio-Optica, Италия).

Парафиновые срезы для иммуногистохимических реакций монтировали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном для лучшей адгезии срезов (Thermo Fisher Scientific, США). Иммуногистохимические реакции с первичными антителами к белкам Ki-67, Araf-1, каспаза-3, CD3, CD11b (Abcam, Великобритания), PCNA (BioLegend, США) и аминокислотной последовательности FLAG (Santa-Cruz, США) проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Положительную реакцию с антителами визуализировали с помощью готового к использованию набора AEC Single Solution system (Abcam, Великобритания). Парафиновые срезы, на которых проводили иммуногистохимическую реакцию, докрашивали гематоксилином Эрлиха и заключали под покровное стекло в глицерин-желатин. В качестве контроля специфической реакции с антителами использовали парафиновые срезы, прошедшие все стадии иммуногистохимических реакций, кроме инкубации с первичными антителами.

Светооптическое исследование парафиновых срезов проводили с помощью светового микроскопа Leica DM2500, оборудованного цифровой камерой DFC420C (Leica, Германия).

Подсчет опухолевых клеток в состоянии митоза проводили на парафиновых срезах опухолевых узлов или осадков асцитической жидкости, окрашенных гематоксилином и эозином. С помощью светового микроскопа, оборудованного цифровой камерой, получали цифровые снимки срезов при увеличении объектива 40х. Для определения количества клеток в состоянии митоза на снимках подсчитывали общее количество клеток опухоли и количество опухолевых клеток в состоянии митоза. При подсчете охватывали не менее 200 клеток на не менее чем 5 снимках образца от каждой мыши. Клетки в состоянии митоза определяли по характерным морфологическим признакам: по наличию конденсированных хромосом.

Подсчет клеток с положительной реакцией с антителами, использованными в данной работе, проводили на парафиновых срезах, докрашенных гематоксилином Эрлиха. С помощью светового микроскопа, оборудованного цифровой камерой получали снимки участков парафиновых срезов, на которых проводили иммуногистохимическую реакцию, при увеличении объектива 40х. На снимках подсчитывали общее количество клеток и количество положительно окрашенных в реакции с антителами клеток, и вычисляли долю этих клеток. При подсчете охватывали не менее 200 клеток на не менее чем 5 снимках образца от каждой мыши.

Электронно-микроскопические исследования

Для ультраструктурного исследования образцы опухолевых узлов, фиксированные в 4% растворе параформальдегида, приготовленного на растворе Хенкса, нарезали на кусочки толщиной 1-2 мм и дофиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия, приготовленном на растворе Хенкса, обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации и ацетоне, затем пропитывали в смеси 1 : 1 ацетона и смолы (смесь эпона и аралдита) в течение 12-14 ч. Затем кусочки переносили в смесь эпона и аралдита с катализатором DMP-30 (SPI, США) и после выдерживания при комнатной температуре (2-3 ч) и при 44°C в течение 12 ч блоки полимеризовали при 53°C. С полученных блоков изготавливали полутонкие срезы толщиной 1-2 мкм с помощью ультрамикротомы EM UC7 (Leica, Германия), монтировали срезы на предметные стекла и окрашивали в течение 1-2 мин Азуром-2. Полученные полутонкие срезы изучали в световом микроскопе для выбора места заточки пирамидки для изготовления ультратонких срезов. Ультратонкие срезы толщиной 70-80 нм изготавливали с помощью ультрамикротомы EM UC7, контрастировали раствором уранилацетата и цитрата свинца стандартным способом. Ультратонкие срезы изучали и получали электронограммы с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония), оснащенного цифровой камерой бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

Изучение изменений цитоскелета клеток карциномы A431 *in vivo*

Монослой клеток A431 инфицировали штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB или штаммом Л-ИВП, множественность заражения 0,01 БОЕ/клетку, и инкубировали при 37°C в течение 24 и 48 ч. Затем клетки снимали с помощью пластикового скребка и осаждали центрифугированием в течение 5 мин при ускорении 3000 g, фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 24 ч при 4°C и обрабатывали для ультраструктурного исследования как описано выше.

Для изучения клеток с помощью флуоресцентного микроскопа монослой клеток карциномы A431 выращивали на покровных стеклах и инфицировали штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB или штаммом Л-ИВП, множественность заражения 0,01 БОЕ/клетку, инкубировали при 37°C в течение 24 и 48 ч. Клетки отмывали фосфатно-солевым буфером и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером, обрабатывали 0,1% раствором тритона X-100 в фосфатно-солевом буфере. Актиновые филаменты визуализировали с помощью TRITC-фаллоидина: клетки карциномы A431 инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с тетраметилродамин-В-изотиоцианатом (TRITC-фаллоидин, Sigma, США), разведенным в отношении 1:5000. Образцы трижды промывали фосфатно-солевым буфером и заключали в 50% глицерин. Образцы хранили при температуре 4°C. Флуоресценцию TRITC-фаллоидина фиксировали с помощью микроскопа AxioImager Z1, оснащенного цифровой камерой AxioCam MR с фильтрами 02, 10, 15 (Zeiss, Германия). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения AxioVision 4 (Zeiss, Германия).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA 8.0.360.0. Статистическую значимость различий определяли с помощью критерия Манна-Уитни-Вилкоксона со значением $P < 0,05$.

Все светооптические и ультраструктурные исследования, а также эксперименты с карциномой Эрлиха выполнены автором лично. Эксперименты с карциномой А431 и введение вирусов проводились сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора д.б.н. Кочневой Галиной Вадимовной и к.б.н. Гражданцевой Антониной Александровной, за что автор приносит им искреннюю благодарность. Автор выражает признательность руководителю отдела микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Таранову Олегу Святославовичу за проведение флуоресцентного исследования. Автор работы принимал непосредственное участие в планировании всех экспериментов, в обсуждении полученных результатов и написании статей.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам группы микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН и своему научному руководителю, д.б.н. проф. Рябчиковой Елене Ивановне за помощь и поддержку при выполнении диссертационной работы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучению противоопухолевого эффекта различных онколитических вирусов посвящены десятки исследований, однако, ни в одной из опубликованных работ не приводятся сведения о структурных параметрах репродукции вирусов и механизмах их воздействия на опухолевые клетки, авторы, как правило, ограничиваются измерением размеров опухоли. Некоторые работы содержат данные иммуногистохимического исследования, показывающие наличие того или иного белка. Однако, для понимания механизма действия лекарственного препарата, необходимо глубокое изучение процессов, происходящих в клетках и тканях под его воздействием. Важнейшим элементом такого исследования служат методы световой и электронной микроскопии в сочетании с иммуногистохимическим анализом. Такой комплекс методов позволяет не просто визуализировать развитие деструктивных процессов в опухолевой ткани, но выяснить их механизмы, установить участие клеток иммунной системы в реализации эффекта препарата, определить особенности клеточных реакций на препарат. Комплексное исследование особенно важно в случае онколитических вирусов, противоопухолевый эффект которых базируется на их репликации, которая повреждает опухолевые клетки и сопровождается нарушением функционирования систем клетки (Al et al., 2015).

Данная работа является комплексным исследованием воздействия онколитического рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24 BOB, экспрессирующего проапоптотический белок апоптин, на ксенографты карциномы человека A431 и сингенную опухоль, карциному Эрлиха, в сравнении с исходным природным штаммом Л-ИВП BOB. Методами световой и электронной микроскопии в сочетании с иммуногистохимическим анализом проведено изучение характеристик опухолей в динамике и установлены морфологические эквиваленты экспрессии апоптина в опухолевых клетках разного происхождения.

Изменения клеток карциномы А431 человека, привитой мышам nude, вызванные репродукцией штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB

Для инициации роста ксенографтов самкам мышей nude подкожно в левое бедро вводили клетки карциномы А431 человека. Рост ксенографтов ежедневно контролировали визуально. Через 10 сут после введения клеток мышам однократно интратуморально вводили рекомбинантный штамм VVdGF-ApoS24/2 BOB в 100 мкл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия. В качестве группы сравнения использовали мышей, которым однократно вводили исходный штамм Л-ИВП BOB в аналогичных дозе и объеме. Группу контроля составляли мыши, которым интратуморально вводили 100 мкл 0,9% стерильного раствора хлорида натрия. Рост опухолевых узлов фиксировали визуально, определяли объем узлов. Мышей выводили из эксперимента через 2, 4, 8, 36 и 55 сут после введения BOB, иссекали опухолевые узлы с окружающими тканями и фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на растворе Хэнкса, для светооптического и ультраструктурного исследований.

На всем протяжении эксперимента происходило увеличение размеров ксенографтов карциномы А431 у мышей контрольной группы, получавших инъекции 0,9% раствора NaCl. Однократные интратуморальные инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП BOB приводили к значительному снижению объема опухолевых узлов по сравнению с мышами контрольной группы (рис 1). Введение мышам штамма VVdGF-ApoS24/2 приводило к более выраженному снижению объема опухолевых узлов, чем введение штамма Л-ИВП BOB (рис 1). На поздних сроках эксперимента, начиная с 43 сут после введения штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB, опухолевые узлы карциномы А431 были плохо различимы на ощупь, при иссечении места, где располагалась опухоль, узлы производили впечатление «высушенных». Опухолевые узлы карциномы А431 у мышей, которые получали штамм Л-ИВП BOB, через 43 сут после введения BOB на ощупь были жесткими и упругими, при разрезе часто оказывались заполненными большим количеством жидкости. Обнаруженные

различия морфологии ксенографтов при введении штаммов ВОВ свидетельствуют о различных механизмах гибели опухолевой ткани, очевидно, связанными с изменениями генома ВОВ. В научной литературе подобные изменения не описаны, что осложняет анализ полученных нами результатов.

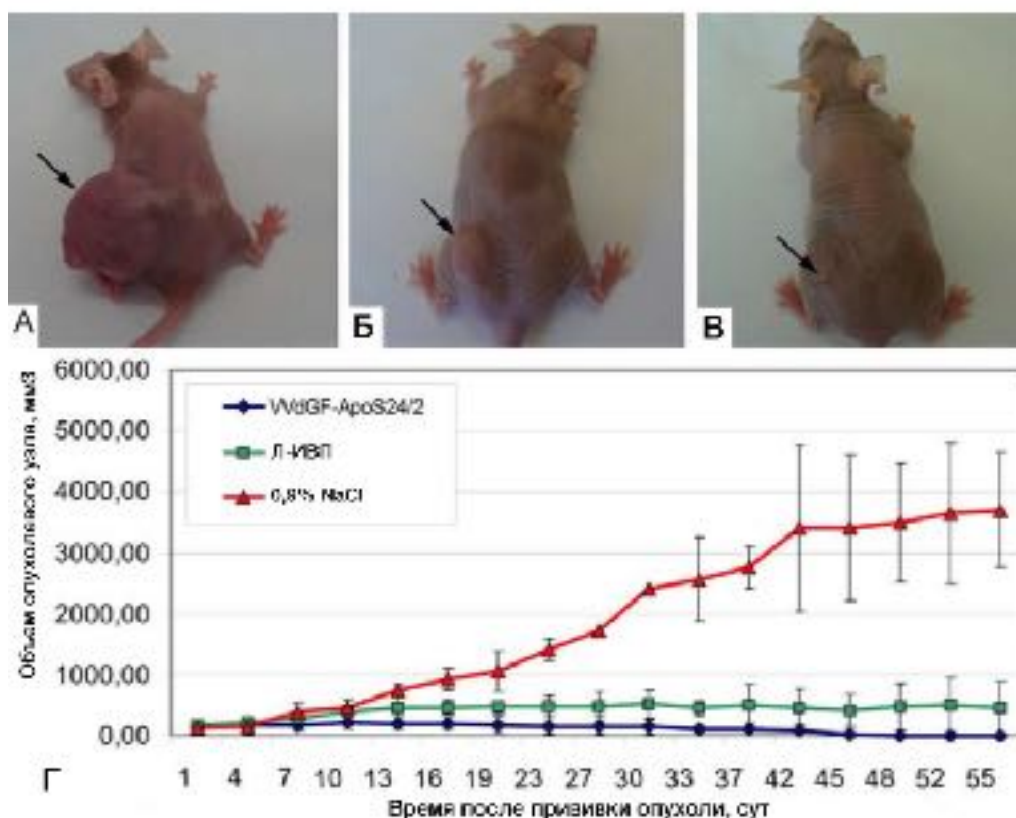


Рисунок 1. **А-В** - Мыши линии nude с привитыми ксенографтами карциномы А431 (показаны стрелками) через 55 суток после интратуморального введения 0,9% раствора хлорида натрия (А), штамма Л-ИВП ВОВ (Б) и штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ (В). **Г** – изменение объема ксенографтов карциномы А431, привитых мышам nude, после интратуморального введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 ВОВ, Л-ИВП ВОВ и 0,9% раствора хлорида натрия.

Морфология опухолевых узлов карциномы А431 после интратуморального введения штаммов ВОВ

Морфологические характеристики ксенографтов карциномы А431, привитых мышам контрольной группы, не изменялись на протяжении всего эксперимента. На срезах ксенографты имели округлую форму, наблюдались «дольки», образованные опухолевыми клетками, которые были разграничены

между собой прослойками соединительной ткани, встречались редкие кровеносные сосуды. По периферии опухолевые узлы карциномы А431 у мышей контрольной группы были окружены соединительнотканной капсулой. Признаки инфильтрации соединительной ткани капсулы клетками лейкоцитарного ряда отсутствовали. В центральной части ксенографтов располагалась зона некротической гибели опухолевых клеток, которая занимала 10 – 25% площади среза ксенографта на всех сроках после введения 0,9% раствора NaCl (рис. 2). Развитие зоны некроза в центре быстрорастущей опухоли является обычным явлением в солидных опухолях, считается, что этот процесс обусловлен недостатком питательных веществ и кислорода (Rundqvist, Johnson, 2013).

Исследование парафиновых срезов ксенографтов карциномы А431 мышей линии nude, окрашенных гематоксилином и эозином, показало, что введение штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ привело к изменениям структуры опухолевых узлов в сравнении с контрольной группой, получавшей инъекции 0,9% раствора NaCl. На срезах ксенографтов карциномы А431 мышей, получавших инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ, увеличивались размеры зоны некротической гибели клеток, которая в среднем занимала 50% площади срезов опухолевых узлов через 2 и 4 сут после введения вирусов (10 – 25% у животных контрольной группы). Как правило, зона некротической гибели клеток была расположена в центральной части опухолевого узла и постепенно распространялась на периферию (рис. 2).

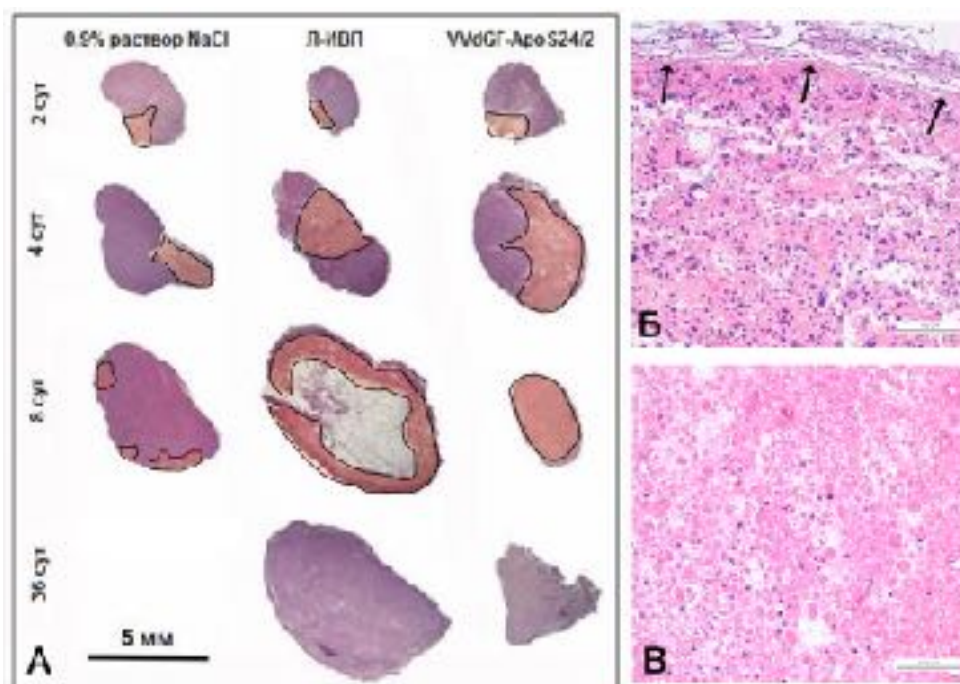


Рисунок 2. А - срезы опухолевых узлов карциномы А431, привитых мышам nude через 2, 4, 8 и 36 сут после интратуморального введения 0,9% раствора NaCl, Л-ИВП ВОВ и VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. Красным цветом выделена зона некротической гибели клеток. Б, В - парафиновые срезы ксенографтов карциномы А431, у мышей линии nude через 8 сут после интратуморального введения штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. Стрелками показана соединительнотканная капсула ксенографтов. Окраска гематоксилином и эозином.

Изучение ультратонких срезов ксенографтов карциномы человека А431, привитой иммунодефицитным мышам nude, обнаружило размножение рекомбинантного и исходного штаммов ВОВ в клетках карциномы А431 через двое сут после однократного интратуморального введения вирусов.

В цитоплазме клеток карциномы А431, зараженных штаммами VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ, наблюдались частицы зрелого ВОВ, которые формировали скопления (рис. 3 А, Б) величиной около 3 мкм. Скопления вирионов штамма Л-ИВП ВОВ имели размеры около 4 мкм. Как правило, на один срез клетки приходилось 1 - 2 скопления вирусных частиц ВОВ, что свидетельствует о высоком уровне репликации вирусов в клетках карциномы А431. Морфологические характеристики вирусных частиц штамма VVdGF-

АpoS24/2 ВОВ заметно не отличались от характеристик частиц штамма Л-ИВП: вирионы имели овальную или кирпичеобразную форму, размеры 250-300 нм. Согласно визуальной оценке около 60% вирионов штамма VVdGF-АpoS24/2 ВОВ имели электронно-прозрачную (пустую) сердцевину, доля вирионов штамма Л-ИВП с электронно-прозрачной сердцевиной составляла около 30%. На срезах около 20% вирусных частиц (визуальная оценка) присутствовала сферическая структура высокой электронной плотности размером около 10 нм, которая могла располагаться как внутри сердцевины, так и за её пределами (рис 3В). В опубликованной литературе не представлены данные, которые бы указывали на природу данной структуры.

Помимо скоплений зрелых частиц ВОВ, в цитоплазме ряда клеток карциномы А431 встречались вирусные фабрики размером 3 - 4 мкм - специфические вирусные образования, в которых происходит размножение вируса осповакцины. Некоторые вирусные фабрики содержали скопления неоформленных вирусных белков и ДНК - вироплазму, имеющую тонкозернистую структуру средней электронной плотности. Частицы незрелого вируса - "полукруглые" мембраны и сферические вирионы, свободно располагались в вироплазме или на её границах. На внешней мембране практически всех незрелых вирусных частиц присутствовали регулярно расположенные "шипики" (спикулы) размером 5-8 нм (рис 2Г, Д). На срезах отдельных незрелых частиц вируса обоих штаммов присутствовала электронно-плотная "точка", идентичная таковой у зрелых вирионов. На ультратонких срезах 25 - 30% незрелых вирионов (визуальная оценка) штамма VVdGF-АpoS24/2 были обнаружены явные дефекты сборки, в то время как для штамма Л-ИВП доля незрелых вирионов с дефектами сборки составляла около 10 - 15%. В некоторых вирусных фабриках встречались нитчатые структуры низкой электронной плотности, "кристаллоидные" структуры, которые, по-видимому, являются следствием неправильной сборки вирионов. Наиболее вероятно, что увеличение числа вирионов штамма VVdGF-АpoS24/2 ВОВ с дефектами сборки, по сравнению со штаммом Л-ИВП является следствием модификации генома при создании рекомбинантного штамма (Liu et al., 2014).

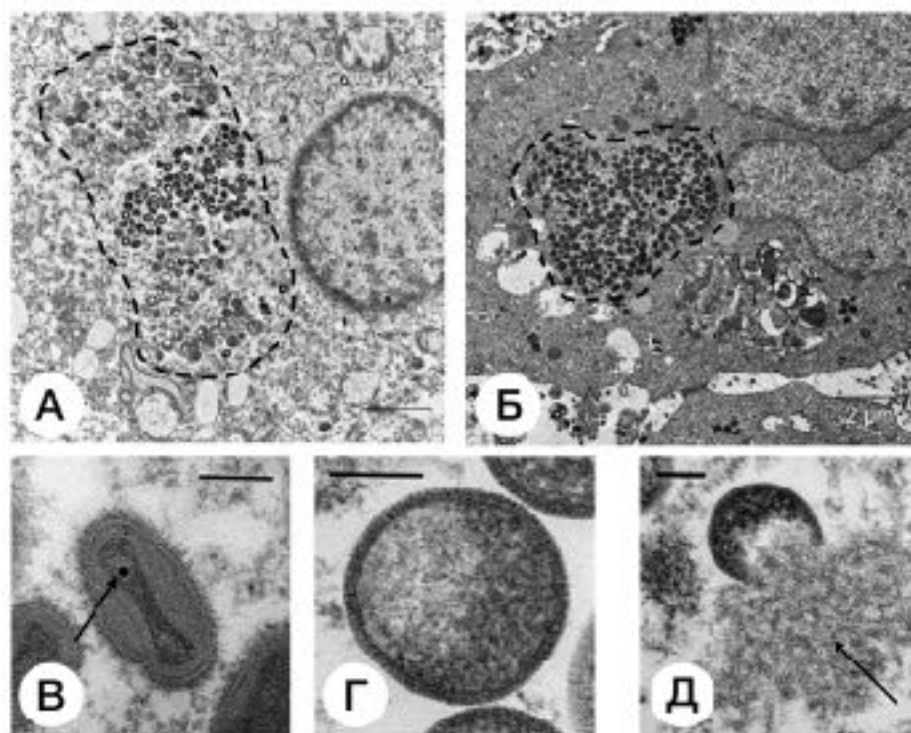


Рисунок 3. Ультратонкие срезы клеток карциномы А431, привитой мышам nude, 2 сут после интратуморального введения ВОВ. А, Б - участки клеток карциномы А431, зараженных штаммом Л-ИВП (А) и VVdGF-ApoS24/2 (Б). Скопления вирусных частиц обведены пунктирной линией. В – зрелый вирион штамма VVdGF-ApoS24/2, стрелкой показана электронноплотная «точка». Г, Д – незрелые вирусные частицы штаммов Л-ИВП (Г) и VVdGF-ApoS24/2 (Д), стрелкой показан участок вироплазмы. Масштабные линии на рисунках В-Г равны 100 нм.

Клетки карциномы А431 через 2 сут после введения вируса, в которых были обнаружены морфологические признаки размножения вирусов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ, располагались преимущественно в центральной части ксенографтов, имели размеры 10 - 13 мкм, ядро с несколькими ядрышками, окруженное большим количеством цитоплазмы низкой электронной плотности. В цитоплазме клеток присутствовали немногочисленные митохондрии, редкие цистерны ЭПР, в единичных клетках отмечались капли жира средней электронной плотности. Некоторые инфицированные клетки находились в состоянии некроза.

Через четверо суток после интратуморального введения мышам nude ВОВ было обнаружено распространение штаммов VVdGF-ApoS24/2 или Л-ИВП по всему объёму ксенографта. Количество клеток карциномы А431 без видимых признаков репродукции ВОВ на ультратонких срезах ксенографтов было невелико. Через 4 сут после введения вирусов морфологические характеристики вирусных частиц и вирусных структур обоих штаммов ВОВ, размножавшихся в клетках карциномы А431, не отличались от наблюдаемых через 2 сут после введения ВОВ мышам.

Важно отметить, что оба штамма вируса ВОВ, и VVdGF-ApoS24/2, и Л-ИВП, размножались исключительно в опухолевых клетках. Не было обнаружено признаков размножения вирусов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП в клетках эндотелия кровеносных сосудов, клетках соединительной ткани внутри опухолевого узла и соединительнотканной капсулы опухолевого узла.

Через 8 сут после интратуморального введения ВОВ ткань опухолевых узлов карциномы А431 была полностью разрушена, клеточная структура опухоли на парафиновых срезах узлов не определялась. Светооптическое изучение парафиновых срезов опухолевых узлов карциномы А431, привитой мышам линии nude, через 8 сут после инъекций Л-ИВП ВОВ выявило наличие в ткани узлов обширных полостей, в которых на разрезе (при заборе материала) обнаруживалось большое количество жидкости. В случае введения штамма VVdGF-ApoS24/2, полости, заполненные жидкостью, в опухолевых узлах отсутствовали. Ткань опухоли была полностью замещена плотным неструктурированным эозинофильным материалом, который, очевидно, представлял собой клеточный детрит.

На ультратонких срезах ксенографтов карциномы А431 через 8 сут после введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 или Л-ИВП ВОВ не было обнаружено ни одной опухолевой клетки, сохранившей свою структуру, опухолевые узлы были заполнены клеточным детритом (рис. 4 А, Б), в отличие от опухолевых узлов мышей контрольной группы. Все клетки карциномы А431, независимо от того, располагались они в центральной части опухолевого узла или на периферии,

были разрушены. Опухолевые узлы карциномы А431 представляли собой соединительнотканые «мешки», заполненные клеточным детритом, липидными каплями и вирусными частицами штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП, которые лежали в ткани опухолевого узла в виде скоплений величиной около 3 мкм. Вирусные фабрики штаммов локализовались среди детрита и имели размер около 5 мкм, незрелые вирусные частицы располагались рыхло. У 10-15% незрелых вирусных частиц были обнаружены явные дефекты сборки (рис 4 В, Г.). Структурные компоненты вирусных частиц штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ через 8 сут после инъекций были хорошо различимы и однозначно идентифицировались, в отличие от клеточных структур.

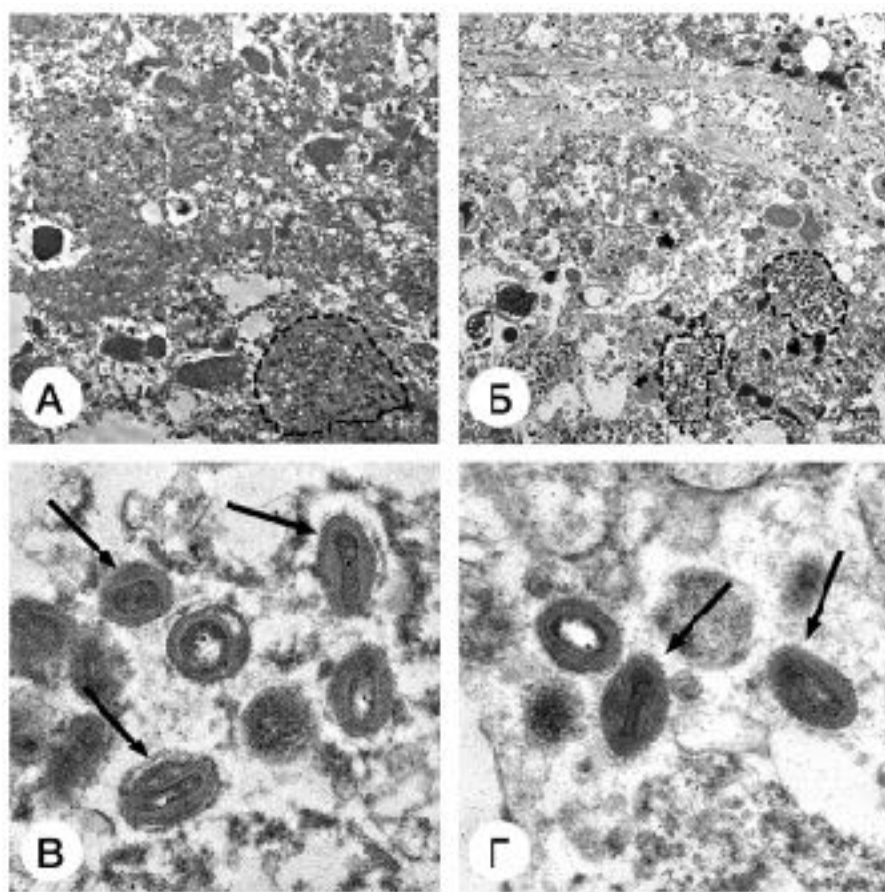


Рисунок 4. Ультратонкие срезы опухолевых узлов карциномы А431, привитых мышам *nude*, 8 сут после интратуморального введения ВОВ. А, Б – «содержимое» опухолевых узлов карциномы А431 после интратуморального введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 (А) и Л-ИВП (Б) ВОВ. Скопления вирионов обведены пунктирной линией. В, Г – зрелые вирусные частицы (показаны стрелками) штаммов VVdGF-ApoS24/2 (В) и Л-ИВП (Г) ВОВ в ткани опухолевых узлов карциномы А431.

Чтобы проверить, действительно ли все «живые» (способные к пролиферации) клетки опухолевых узлов карциномы А431 были разрушены по истечении восьми сут после введения ВОВ, на парафиновых срезах узлов проводили иммуногистохимическое выявление белка Ki-67. Известно, что белок Ki-67 является маркером клеток, способных к пролиферации и широко используется в исследованиях онкологических заболеваний, в том числе - диагностических (Gerdes et al., 1984; Braun et al., 1988; Pezzilli et al., 2016). Проведенное исследование не выявило специфического связывания анти-Ki-67 антител на парафиновых срезах опухолевых узлов карциномы А431 мышей nude, выведенных из эксперимента через 8 сут после интратуморального введения ВОВ, в отличие от опухолевых узлов мышей, выведенных из эксперимента через 2 и 4 сут после введения ВОВ (рис. 5). Этот факт свидетельствует о том, что после 8 сут после введения ВОВ мышам в ткани опухолевых узлов не остается клеток карциномы А431, способных к дальнейшей пролиферации. Аналогичное исследование ксенографтов через 36 и 55 сут после введения ВОВ также не выявило Ki-67-позитивного окрашивания, клетки на срезах отсутствовали.

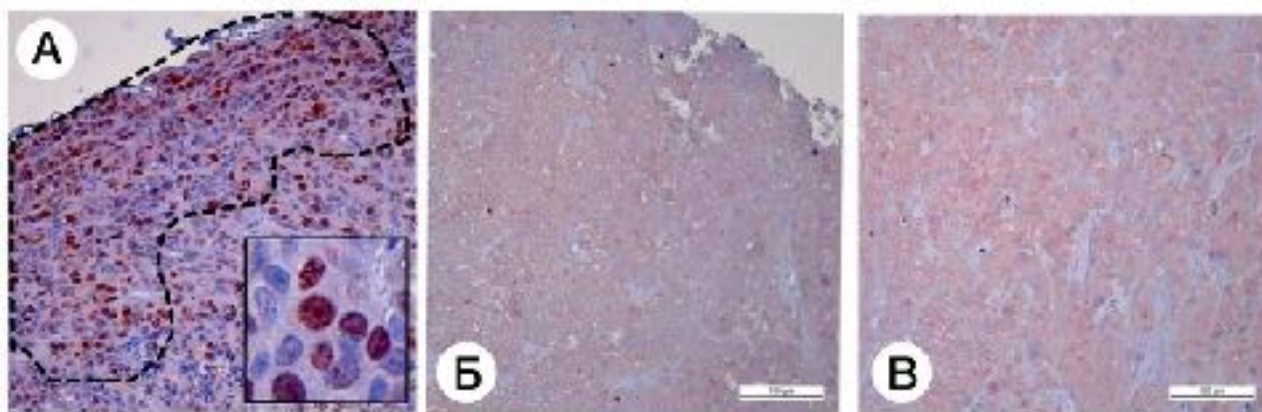


Рисунок 5. Парафиновые срезы периферической части опухолевых узлов карциномы А431, привитой мышам *nude*, иммуногистохимическое выявление белка Ki-67. А - 4 сут после интратуморального введения штамма VVdGF-ApoS24/2. Б – 8 сут после интратуморального введения штамма Л-ИВП. В - 8 сут после интратуморального введения штамма VVdGF-ApoS24/2. Пунктирной линией обведены клетки ксенографтов, в ядрах которых видна положительная реакция с анти-Ki-67 антителами (на врезке показаны при большом увеличении). Визуализация антигена хромогеном АЕС, докраска гематоксилином.

На поздних сроках эксперимента, через 36 и 55 сут после интратуморального введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ мышам с привитой карциномой А431 структура опухолевых узлов значительно не отличалась от структуры, наблюдаемой через 8 сут после введения ВОВ.

Особо следует отметить, что процесс разрушения ткани опухолевых узлов карциномы А431 не сопровождался воспалительной реакцией: на парафиновых срезах отмечались лишь редкие небольшие скопления клеток лейкоцитарного ряда в просветах кровеносных сосудов через 4 сут после интратуморального введения мышам штаммов ВОВ. Через 8 сут после введения ВОВ были обнаружены небольшие редкие скопления нейтрофилов в просветах сохранившихся кровеносных сосудов, а также в соединительнотканной капсуле, окружающей опухолевые узлы карциномы А431. В ткани опухолей среди клеточного детрита отмечались единичные макрофаги, на ультратонких срезах было видно, что они содержат большое количество фагосом, заполненных клеточным детритом. На поздних стадиях эксперимента, через 36 и 55 сут после

интратуморального введения ВОВ, ни в ткани опухолевых узлов, ни в окружающей их соединительнотканной капсуле, клетки лейкоцитарного ряда выявлены не были. Отсутствие признаков эффекторных реакций иммунной системы мышей линии nude на интенсивное развитие опухолевых узлов карциномы А431 и введение ВОВ не удивительно, и, очевидно, является следствием подавления иммунной системы у этих животных.

Оценка репродукции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в ксенографтах карциномы А431

Для определения уровня репродукции ВОВ в ткани опухолевых узлов карциномы А431, привитой мышам nude, в гомогенате опухоли проводили титрование вируса методом бляшек на монослое клеток CV-1. Результаты исследования показали, что содержание вирусных частиц штамма VVdGF-ApoS24/2 в 1 мл гомогената опухолевой ткани в период с 1 по 4 сут после введения ВОВ возрастало, затем происходило постепенное снижение титра вируса. Содержание в гомогенате опухоли вирусных частиц штамма Л-ИВП ВОВ в период до 8 сут после интратуморального введения нарастало, затем снижалось, аналогично штамму VVdGF-ApoS24/2 ВОВ (рис. 6).

Содержание вирусных частиц штамма Л-ИВП в 1 мл гомогената опухолевых узлов карциномы А431 было выше, чем штамма VVdGF-ApoS24/2 в период с 1 по 16 сут после интратуморального введения ВОВ мышам. В период с 17 по 35 сут после введения ВОВ различия нивелировались, и содержание вирусных частиц штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в 1 мл гомогената опухоли заметно не различалось.

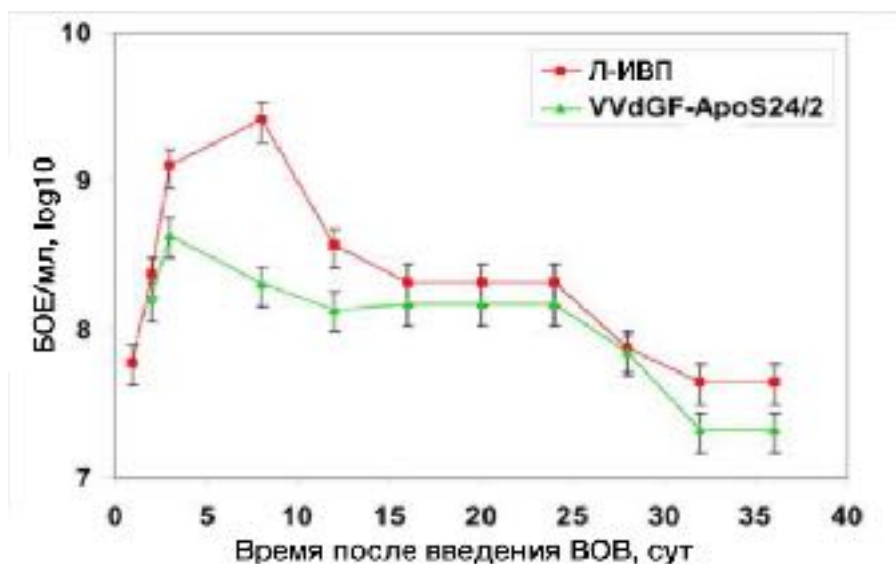


Рисунок 6. Изменение содержания вирусных частиц штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в 1 мл 10%-го гомогената опухолевых узлов карциномы А431, привитых мышам nude, после интратуморального введения ВОВ.

Результаты титрования вируса в ткани опухолевых узлов указывают на то, что оба штамма ВОВ, и VVdGF-ApoS24/2, и Л-ИВП, активно размножались в клетках карциномы А431 в течение первых 4-8 сут эксперимента, после чего размножение вируса остановилось. Очевидно, остановка репликации вирусов связана с отсутствием неповрежденных клеток, способных поддерживать репродукцию вируса, в ткани опухолевых узлов карциномы А431 через 8 сут после инъекций. Выявление способного к размножению вируса в гомогенатах опухолевых узлов через 35 сут после инъекций свидетельствует о сохранении штаммами инфекционных свойств при длительном нахождении в ткани разрушенного опухолевого узла карциномы А431, привитого мышам nude.

Таким образом, штаммы ВОВ VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП способны активно размножаться в клетках карциномы человека А431, привитой иммунодефицитным мышам линии nude, однако продукция штамма VVdGF-ApoS24/2 несколько ниже, что обусловлено искусственным удалением гена *CIIR*, кодирующего вирусный фактор роста (Martin et al., 2012; Kochneva et al.,

2013). Оба штамма ВОВ размножаются исключительно в опухолевых клетках ксенографта и не распространяются в окружающую его соединительную ткань. Репродукция штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ приводит к значительному снижению объема опухолевых узлов карциномы А431, привитых мышам nude по сравнению с мышами контрольной группы, получавшими 0,9% раствор NaCl. Ведение мышам рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ приводило к более выраженному снижению объема опухолевых узлов по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП ВОВ.

Экспрессия апоптоина в клетках карциномы А431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 ВОВ

Встройка в геном вирусов проапоптотических белков – один из вариантов усиления их противоопухолевых свойств. Рекомбинантный штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ содержит встройку белка апоптоина, сцепленного с сигнальной последовательностью аминокислот FLAG. Показано, что последовательность FLAG не влияет на экспрессию белка апоптоина рекомбинантным штаммом VVdGF-ApoS24/2 и специфически связывается с анти-FLAG антителами (Kochneva et al., 2013). Связывание аминокислотной последовательности FLAG с анти-FLAG антителами однозначно свидетельствует об экспрессии в клетке белка апоптоина. Ген, кодирующий апоптин, является геном вируса анемии цыплят и отсутствует в клетках млекопитающих, поэтому экспрессия апоптоина невозможна без репликации рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 (Oro et al., 2004; Kochneva et al., 2013). Соответственно, позитивная иммуногистохимическая реакция с анти-FLAG антителами не только свидетельствует о присутствии в клетках апоптоина, но и о репликации штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ иЮ соответственно, позволяет выявить клетки в которых происходит его размножение. Чтобы подтвердить экспрессию апоптоина штаммом VVdGF-ApoS24/2 в клетках карциномы А431, привитой мышам nude, сигнальную последовательность аминокислот FLAG иммуногистохимически выявляли с помощью специфических антител на парафиновых срезах ксенографтов карциномы А431. Светооптическое изучение парафиновых срезов

узлов карциномы A431 через 2 и 4 сут после введения мышам штамма VVdGF-ApoS24/2 выявило четкое специфическое окрашивание в виде небольших гранул хромогена в цитоплазме опухолевых клеток. Следует отметить, что в ядрах клеток карциномы A431 специфическая окраска отсутствовала. В качестве контроля использовали парафиновые срезы карциномы A431 после введения штамма Л-ИВП ВОВ или 0,9% раствора NaCl, на контрольных срезах специфического окрашивания обнаружено не было, реакция была отрицательная (рис 7А, Б).

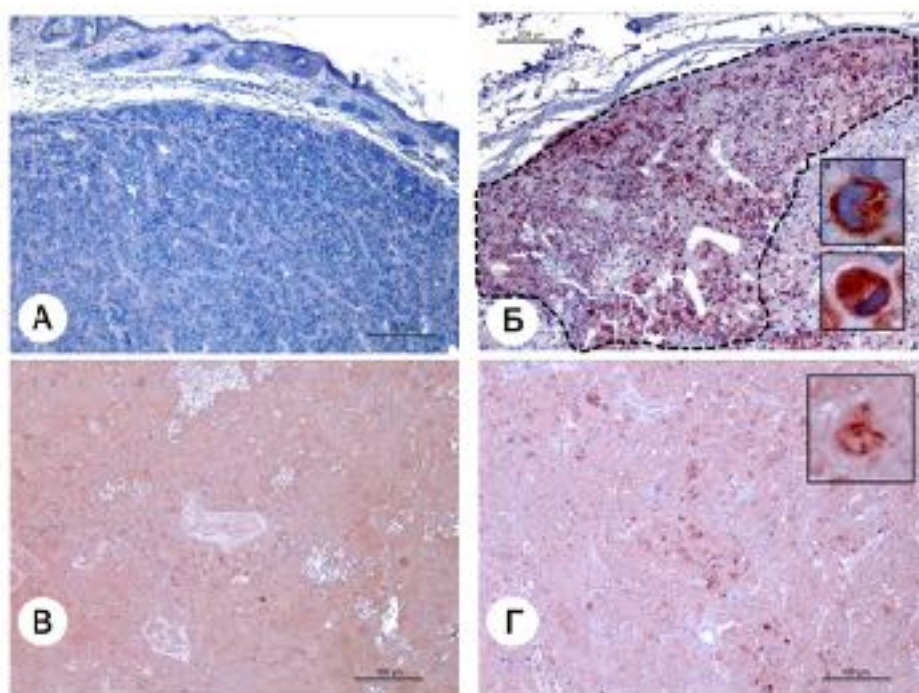


Рисунок 7. Парафиновые срезы опухолевых узлов карциномы A431, привитых мышам nude. Иммуногистохимическое выявление комплекса FLAG-апоптин с помощью анти-FLAG антител. А, В – 2 и 36 сут после интратуморального введения штамма Л-ИВП соответственно. Б, Г - 2 и 36 сут после интратуморального введения штамма VVdGF-ApoS24/2 соответственно. Пунктирной линией обведены участки активной экспрессии апоптина. На вставках крупным планом показаны клетки с позитивной реакцией с анти-FLAG антителами. Визуализация антигена хромогеном АЕС, докраска гематоксилином.

Иммуногистохимическая реакция с анти-FLAG антителами на парафиновых срезах карциномы мышей, которых выводили из эксперимента

через 8 сут после введения штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB и в более поздние сроки, показала, что среди клеточного детрита присутствует материал, который специфически связывается с анти-FLAG антителами (рис. 7В, Г). С увеличением срока эксперимента количество такого материала на единицу площади среза ксенографта постепенно снижалось, и через 55 сут после введения штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB материал, который выявляется анти-FLAG антителами, на срезах карциномы A431 практически отсутствовал. Полученные данные говорят о том, что апоптин, сцепленный с аминокислотной последовательностью FLAG, продуцируется в клетках карциномы A431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB *in vivo*, локализуясь при этом исключительно в цитоплазме. Апоптин остается в ткани опухолевых узлов карциномы A431 после разрушения клеток, но с течением времени, по-видимому, деградирует.

Индукция апоптоза в клетках карциномы A431 при воздействии BOB

Гибель клеток путем апоптоза регистрируют разнообразными методами, однако, только электронно-микроскопическое исследование не дает ложноположительных результатов, поскольку морфологическая картина апоптоза уникальна. Наиболее яркие изменения наблюдаются в ядре, где происходит выраженная конденсация хроматина, который формирует характерные полулуния.

Ультраструктурное исследование срезов ксенографтов карциномы A431 выявило картины апоптоза отдельных опухолевых клеток (рис 8А) после введения обоих штаммов BOB, равно как и в контрольной группе. Клетки округлялись, в их ядрах наблюдался конденсированный хроматин, деструктивные изменения органоидов развивались позднее. Однако, ультраструктурное исследование не позволяет установить стадии апоптоза и пути его развития. Для решения этих задач применяют иммуногистохимический анализ на парафиновых срезах, который также позволяет сделать количественную оценку числа клеток в состоянии апоптоза.

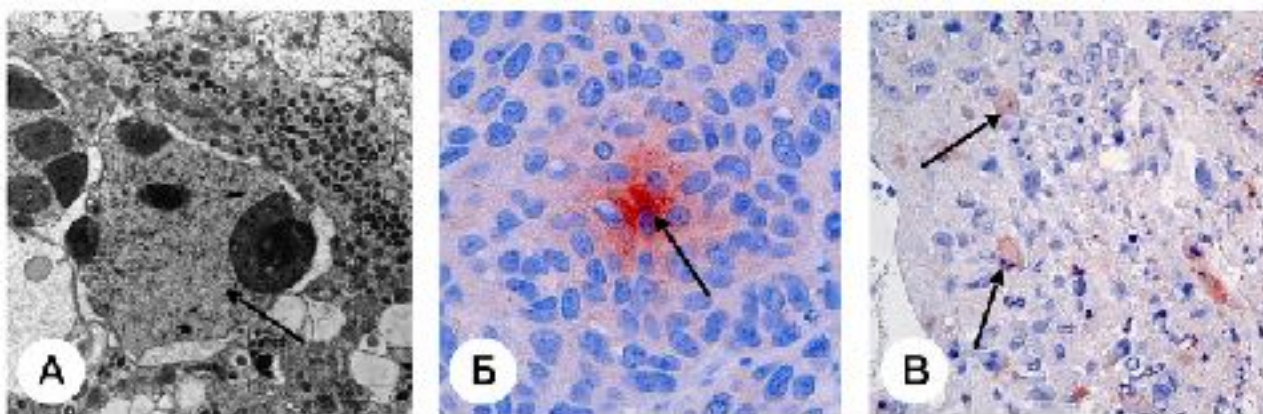


Рисунок 8. А – Ультратонкий срез ксенографта карциномы А431, привитый мыши *nude*. 4 сут после введения штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. Опухолевая клетка в состоянии апоптоза показана стрелками. Б, В - Парафиновые срезы опухолевых узлов карциномы А431, привитых мышам *nude*. Б – 4 сут после интратуморального введения 0,9% раствора хлорида натрия. В - 4 сут после интратуморального введения штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. Стрелками показаны клетки, в которых иммуногистохимически выявлялись белок Аraf-1 (Б) и каспаза-3 (В). Визуализация антител геном АЕС, докраска гематоксилином.

Чтобы установить, индуцирует ли апоптин процесс апоптоза в клетках карциномы А431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2, на парафиновых срезах опухолевых узлов проводили иммуногистохимические реакции с антителами к белкам Аraf-1 и каспаза-3 (*caspase-3*) (рис. 8 Б, В), которые являются маркерами апоптоза и экспрессируются на различных его стадиях. Известно, что белок Аraf-1 входит в состав апоптосомы и является маркером митохондриального пути индукции апоптоза. Каспаза-3 является эффекторным белком, присутствие зрелой каспазы 3 в клетке свидетельствует о конечных стадиях процесса апоптоза (Burek et al., 2006; Wang et al., 2016).

Количество клеток карциномы А431, экспрессирующих белок Аraf-1, на парафиновых срезах опухолевых узлов карциномы А431 было невелико и не различалось у животных после введения обоих штаммов ВОВ и 0,9% раствора NaCl: 1,1 – 1,5 на мм² среза через 2 сут и 0,6 – 1,0 на мм² среза через 4 сут после инъекций. На более поздних сроках эксперимента количество клеток

карциномы А431, экспрессирующих белок Аraf-1, на парафиновых срезах было близко к нулю.

Подсчет количества клеток карциномы А431, экспрессирующих каспазу-3, на парафиновых срезах опухолевых узлов показал, что введение штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ приводило к заметному увеличению числа позитивно окрашенных клеток по сравнению с введением 0,9% раствора NaCl через 2 и 4 сут после инъекций (таблица 1). Выявленные различия были достоверны, $p < 0,05$.

	2 сут п/в	4 сут п/в
0,9% раствор NaCl	16±2,1	10±2,4
VVdGF-ApoS24/2	72±3,8	72±3,8
Л-ИВП	77±3,7	67±3,5

Таблица 1. Количество каспаза-3-позитивных клеток на 1 мм² парафинового среза ксенографтов карциномы А431 у мышей, получавших интратуморальное введение штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ и 0,9% раствор NaCl.

Отсутствие различий количества Аraf-1-положительных клеток карциномы А431 на срезах опухолей мышей после введения 0,9% раствора NaCl и штаммов ВОВ, обусловлено, скорее всего, тем, что апоптин действует по р53-независимому пути (Los et al., 2009). Кроме того, известно, что в клетках карциномы А431 присутствует мутантная форма проапоптотического белка р53 (Huang et al., 2006; Alanazi et al., 2013).

Результаты иммуногистохимических реакций с антителами к каспазе-3 свидетельствуют, что однократное интратуморальное введение штаммов ВОВ VVdGF-ApoS24/2 или Л-ИВП значительно усиливает процесс гибели клеток карциномы А431 путем апоптоза. Это усиление, очевидно, связано с влиянием репродукции ВОВ на процесс апоптоза клеток карциномы А431

in vivo. Влияние апоптина, экспрессируемого рекомбинантным ВОВ, на развитие апоптоза клеток опухолевых узлов карциномы А431 не обнаружено.

Ранее было показано, что белок апоптин в опухолевых клетках имеет ядерную локализацию, а в нормальных нетрансформированных клетках он локализован в цитоплазме, именно этим объясняют избирательное воздействие апоптина на опухолевые клетки (Los et al., 2008). По-видимому, локализация апоптина в ядрах опухолевых клеток принципиально важна для запуска апоптоза, однако данных, позволяющих утверждать это однозначно, недостаточно. Локализация апоптина в ядрах опухолевых клеток наблюдалась в клетках SGC-7901, зараженных рекомбинантным апоптин-продуцирующим аденовирусом AdHu5 *in vitro* (Li et al., 2013). Была показана экспрессия апоптина в клетках ксенографтов карциномы A549, привитых мышам *nude*, которые получали инъекции рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма вируса болезни Ньюкасла, однако, данные о локализации апоптина в ядрах клеток или в цитоплазме, в работах не приведены (Wu et al., 2012). В одной из немногих работ, посвященных изучению противоопухолевого действия апоптин-продуцирующих поксвирусов, локализация белка апоптина в клетках также не уточняется (Li et al., 2006).

Известно, что ВОВ способен после заражения за короткое время полностью «подчинить» себе все синтетические процессы внутри клетки (Mark et al., 1991). Вероятно, что вследствие активного размножения штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ в клетках ксенографтов карциномы A431 внутриклеточные процессы, которые необходимы для проникновения апоптина в ядра клеток, нарушаются, и апоптин накапливается в цитоплазме, не имея возможности реализовать свой проапоптотический потенциал.

Влияние апоптина на организацию микрофиламентов клеток карциномы A431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 ВОВ

Изучение парафиновых и ультратонких срезов ксенографтов карциномы A431 у мышей *nude* через 36 и 55 сут после введения штаммов ВОВ, выявило значительные различия в структуре опухолей. Так, после введения штамма Л-ИВП ВОВ опухолевые узлы были заполнены клеточным детритом вперемешку с частицами ВОВ, коллагеновыми волокнами и липидными каплями, в ткани

опухоли наблюдались обширные полости, заполненные жидкостью. После введения штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB узлы карциномы A431 были заполнены бесструктурным материалом, полости отсутствовали. Количество клеточного детрита было незначительно по сравнению с узлами карциномы A431 после введения штамма Л-ИВП BOB, клетки «замещались» скоплениями филаментов (рис. 9А, Б). Жидкость и полости в опухолевой ткани отсутствовали.

На ультратонких срезах опухолевых узлов карциномы A431 мышей, получавших инъекции штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB, были обнаружены большие скопления волокон, которые напоминали очертания клеток. На ультратонких срезах опухолевых узлов мышей после введения штамма Л-ИВП BOB, такие структуры отмечались несравнимо реже. Волокна имели толщину 7-10 нм и, очевидно, являлись актиновыми и промежуточными филаментами (рис. 9 В, Г). Можно сказать, что на ультратонких срезах карциномы A431 через 36 и 55 сут после введения штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB, мы обнаружили своеобразные «мумии» клеток.

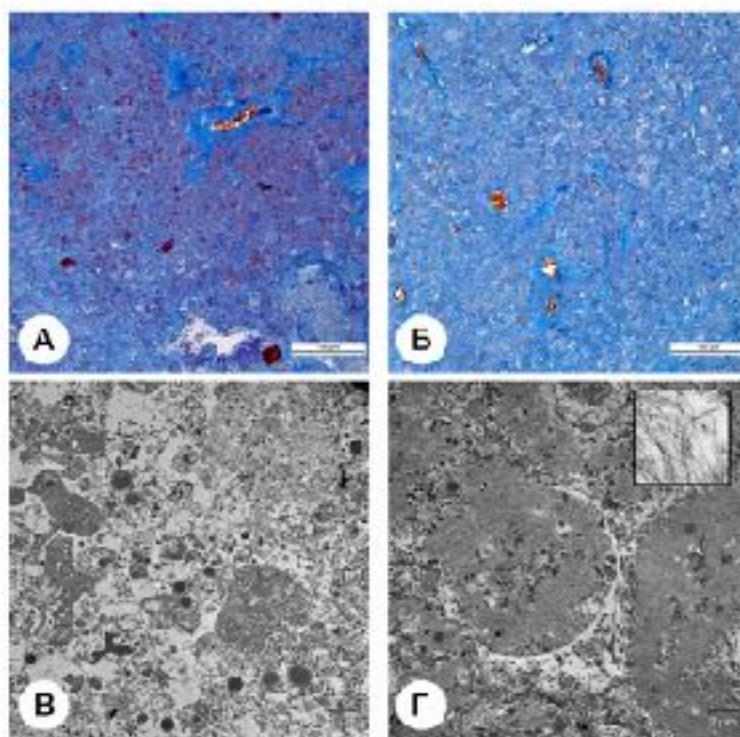


Рисунок 9. Срезы опухолевых узлов карциномы А431, привитых мышам *nude*. А, В – 36 сут после интратуморального введения штамма ЛИВП. Б, Г - 36 сут после интратуморального введения штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB. А, Б – парафиновые срезы, окраска гематоксилином и эозином, В, Г – ультратонкие срезы. На врезке показаны волокна предположительно актиновых и промежуточных филаментов при большом увеличении.

Для более глубокого изучения изменений цитоскелета клеток карциномы А431 при заражении штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB был проведен эксперимент *in vitro*. Культуру клеток карциномы А431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 или Л-ИВП BOB, обрабатывали TRITC-фаллоидином и визуализировали актиновые филаменты с помощью флуоресцентного микроскопа. В интактных клетках карциномы А431 были отчетливо видны длинные тяжи актиновых филаментов, равномерно распределенные в цитоплазме. В клетках, зараженных штаммом Л-ИВП BOB, были обнаружены небольшие скопления актиновых филаментов, расположенные на периферии клеток. В цитоплазме клеток карциномы А431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2, присутствовали округлые скопления актиновых филаментов, размер которых был существенно крупнее, чем в клетках, зараженных штаммом Л-

ИВП. Скопления были равномерно распределены в цитоплазме клеток карциномы А431 (рис 10 А-В).

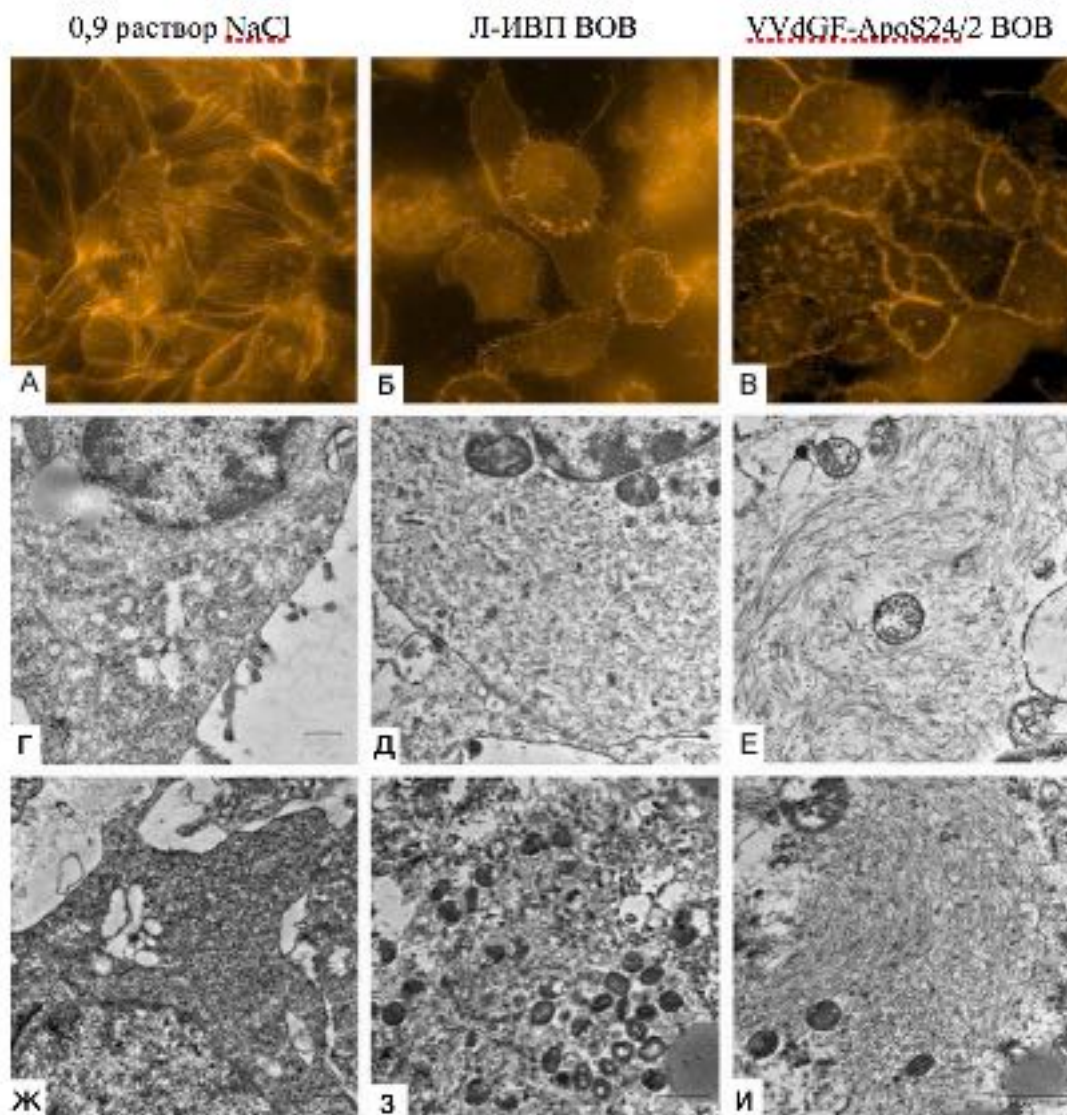


Рисунок 10. А, Б, В - Фотографии культуры intactных (А) клеток карциномы А431, клеток зараженных штаммом Л-ИВП ВОВ (Б) и клеток зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 ВОВ (В), выполненные с помощью флуоресцентного микроскопа. Актиновые филаменты визуализированы TRITC-фаллоидином. Г, Д, Е – ультратонкие срезы осадков культур intactных (Г) клеток карциномы А431, клеток зараженных штаммом Л-ИВП ВОВ (Д) и клеток, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 ВОВ (Е). Ж, З, И – ультратонкие срезы ксенографтов карциномы А431, привитой мышам *nude*, получавшим инъекции 0,9% раствора NaCl (Ж), штамма Л-ИВП ВОВ (З) и штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ (И). Фотографии А-Е сделаны через 48 ч после заражения клеток *in vitro*. Фотографии Ж-И сделаны через 36 сут после интратуморального введения ВОВ мышам.

Ультраструктурное исследование клеток карциномы А431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2 ВОВ *in vitro*, выявило в цитоплазме клеток скопления волокон толщиной 7-10 нм, аналогичные обнаруженным на ультратонких срезах опухолевых узлов карциномы А431 у мышей *nude* после введения штамма VVdGF-ApoS24/2. Таким образом, репликация штамма VVdGF-ApoS24/2 в клетках карциномы А431 приводила к накоплению большого количества филаментов, включая актиновые, в цитоплазме клеток *in vivo* и *in vitro*. Репликация штамма Л-ИВП ВОВ в клетках карциномы А431, напротив, сопровождалась дезорганизацией актиновых филаментов (рис. 10 Г-Е).

Влияние репликации поксвирусов на цитоскелет клетки-хозяина, в том числе на актиновые филаменты было отмечено ранее (Ploubidou, Way, 2001; Rottner, Strada, 2009). Накопление актиновых филаментов в цитоплазме клеток А431, зараженных вирусом VVdGF-ApoS24/2, описанное в настоящей работе, несомненно, является следствием экспрессии апоптина. Взаимодействие апоптина с элементами цитоскелета, такими как β -актин, α - и β -тубулин, описано на культуре клеток линии H1299, однако механизм взаимодействия не установлен (Teodoro et al., 2004). Вероятнее всего, апоптин напрямую, или в комплексе с неустановленными молекулами, способен блокировать деполимеризацию актина, что приводит к накоплению актиновых филаментов в цитоплазме клеток карциномы А431 *in vivo* и *in vitro*. Отсутствие возможности специфического выявления промежуточных филаментов не позволило нам оценить их изменения в зараженных ВОВ клетках. Однако, объем филаментозных структур в цитоплазме ксенографтов клеток карциномы А431 позволяет предположить, что промежуточные филаменты также принимают участие в «мумификации» клеток. Это предположение основано на известных свойствах промежуточных филаментов, которые сохраняют целостность при различных воздействиях на клетку (Margiotta, Vucchi, 2016).

Процесс гибели клеток ксенографтов карциномы А431, развивающейся после введения в опухоль штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ, нельзя отнести ни к

некрозу, ни к апоптозу, поскольку на срезах опухолей не было обнаружено характерных морфологических признаков этих процессов. Иммуногистохимические реакции с антителами к белкам - маркерам апоптоза (Araf-1 и каспаза-3) не выявили увеличения числа клеток в состоянии апоптоза на фоне репродукции рекомбинантного штамма ВОВ. Сходная картина была описана в работе по изучению противоопухолевого действия штамма Листер ВОВ на клетках карциномы яичника, в которой был описан процесс гибели клеток карциномы яичников, зараженных штаммом Листер ВОВ: клетки имели признаки некроза, апоптоза и аутофагии одновременно. Авторы работы назвали данный вариант гибели опухолевых клеток «программируемым некрозом» (Whilding et al., 2013). Очевидно, что особенности вирус-индуцированной гибели опухолевых клеток зависят от штамма онколитического вируса. Это согласуется с результатами исследований противоопухолевых свойств штамма WR ВОВ, который индуцировал апоптоз в опухолевых клетках линии HeLa, но не в клетках линии BSC-40, в то время как штаммы Druwax и Praha ВОВ индуцировали апоптоз и в клетках линии HeLa, и в клетках BSC-40 (Liskova et al., 2011).

Проведенное нами исследование показало, что однократные интратуморальные инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ мышам nude с привитой подкожно карциномой A431 приводили к значительному снижению объема опухолевых узлов по сравнению с инъекциями 0,9% раствора NaCl. Интенсивность репликации штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ была заметно ниже, чем у исходного штамма Л-ИВП ВОВ, в то время как объем опухолевых узлов уменьшался более эффективно. Несомненно, деструкция клеток под действием размножающегося вируса, является главным механизмом гибели опухолевых клеток ксенографтов карциномы A431. Однако, полученные данные указывают на отсутствие прямой связи между уровнем репродукции штаммов и уменьшением объема ксенографтов, что говорит о присутствии дополнительных механизмов, влияющих на объем опухоли, в которую был введен рекомбинантный вирус.

Более выраженное уменьшение объема опухолевых узлов карциномы А431 после интратуморального введения рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB по сравнению с введением исходного штамма Л-ИВП и более низкий уровень репродукции рекомбинантного штамма BOB свидетельствуют об усилении противоопухолевых свойств BOB после встройки в геном гена, кодирующего апоптин. Однако, эффект усиления противоопухолевых свойств рекомбинанта оказался не связанным с индукцией апоптоза, как это ожидалось.

В отличие от ранее опубликованных исследований, выявивших ядерную локализацию апоптина (Danen-Van Oorschot et al., 2003), апоптин, экспрессирующийся в составе генома рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB, не проникал в ядра опухолевых клеток, а накапливался в цитоплазме клеток ксенографтов карциномы А431. Экспрессия апоптина штаммом VVdGF-ApoS24/2 сопровождалась накоплением в цитоплазме клеток карциномы А431 актиновых филаментов *in vitro* и *in vivo*, в отличие от узлов с введением штамма Л-ИВП и 0,9% раствора хлорида натрия, что свидетельствует о влиянии апоптина на пространственную организацию цитоскелета клеток карциномы А431.

Сокращение размеров опухолевых узлов карциномы А431 при размножении рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB, экспрессирующего белок апоптин, сопровождалось «усыханием» опухолей, которые с трудом удавалось нащупать при длительных сроках наблюдения. Несомненно, «усыхание» легче переносится организмом, чем формирование крупных «мешков», заполненных жидкостью, у мышей, получавших инъекции штамма Л-ИВП.

Механизмы противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB на сингенную карциному Эрлиха, привитую мышам

Мыши nude, использованные в нашем эксперименте, которым подкожно вводили клетки человеческой карциномы A431 с целью формирования ксенографтов и последующего изучения на полученной модели противоопухолевого действия рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB, являются иммунодефицитными (Jin et al., 2010). Отсутствие «нормальной» иммунной системы не позволяет изучить её возможное влияние на процесс разрушения опухоли вследствие размножения рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB. Для более глубокого понимания механизма противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB было необходимо изучить его воздействие на сингенную опухоль у иммунокомпетентных животных. С этой целью было проведено изучение противоопухолевого эффекта BOB на мышиную карциному Эрлиха, которую прививали подкожно мышам линии C57Bl, обладающим «нормальной» иммунной системой (Bavia et al., 2016). В этих экспериментах была использована такая же схема введения и дозы вирусов, как и при исследовании ксенографтов карциномы A431.

Влияние введения BOB на морфологию опухолевых узлов карциномы Эрлиха

Карцинома Эрлиха – случайно возникшая опухоль мышей железистого происхождения. Асцитную карциному Эрлиха получили в 30-х годах XX века путем перевивки карциномы молочной железы в брюшную полость мышей. Со временем клетки асцитной карциномы Эрлиха утратили признаки тканевой специфичности и в настоящее время считаются недифференцированными. Согласно опубликованным данным, клетки асцитной карциномы Эрлиха имеют размер 30-40 мкм и хорошо размножаются в перитонеальной полости мышей, а также способны формировать солидные узлы. В настоящее время карциному Эрлиха используют как модель злокачественной опухоли мышей в экспериментальной онкологии (Инжеваткин, 2004).

Опухолевые узлы (трансплантаты) карциномы Эрлиха, привитой подкожно в бедро мышам линии C57Bl, существенно отличались по своему строению от ксенографтов карциномы A431, привитой мышам nude. Все узлы карциномы Эрлиха имели неправильную форму, без четких границ. Изучение парафиновых срезов показало, что карцинома Эрлиха имеет агрессивный инвазивный характер роста: опухолевые клетки проникали между мышечных волокон, соединительнотканная капсула, аналогичная окружающей ксенографты карциномы A431, отсутствовала (рис. 11). Опухолевые клетки, составляющие узлы привитой подкожно мышам карциномы Эрлиха, имели неправильную форму и плотно прилегали друг к другу. На парафиновых срезах встречались клетки в состоянии митоза, апоптотические тельца, наблюдались зоны некроза (рис. 11). Размеры зон некроза визуальнo не различались у мышей, получавших инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2, Л-ИВП ВОВ, или 0,9% раствор хлорида натрия. На ультратонких срезах опухолевых узлов карциномы Эрлиха было обнаружено, что большую часть объема клетки занимали ядра, которые содержали матрикс средней электронной плотности и два-три ядрышка. В цитоплазме, которая имела среднюю электронную плотность, присутствовали митохондрии, цистерны небольшого аппарата Гольджи, редкие короткие цистерны шероховатого и гладкого ЭПР, единичные капли жира. Основная часть цитоплазмы была заполнена свободными рибосомами.

Однократное интратуморальное введение штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ мышам линии C57Bl с привитой подкожно карциномой Эрлиха приводило к значительному уменьшению средних размеров опухолевых узлов карциномы по сравнению с мышами контрольной группы (измерения размеров опухоли на животных). Однако, заметных различий объема опухолевых узлов карциномы Эрлиха у мышей, получавших штаммы VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ не наблюдалось (рис. 12).

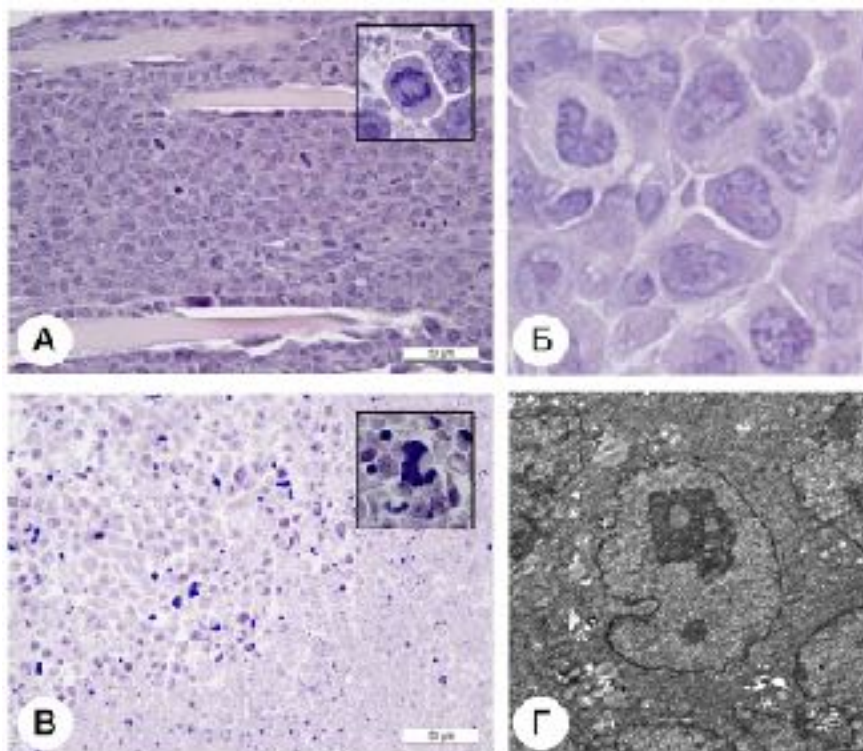


Рисунок 11. Участки опухолевых узлов карциномы Эрлиха, привитой мышам линии С57В1, 4 сут после интратуморального введения препаратов. **А** - зона пролиферации опухолевого узла, введение штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ, **Б** – зона некротической гибели опухолевых клеток, введение штамма Л-ИВП ВОВ. **В** – опухолевые клетки, введение 0,9% раствора NaCl. **Г** – введение штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. На врезках крупным планом показаны клетка карциномы Эрлиха в состоянии митоза (**А**) и апоптотические тельца (**Б**). **А-В** – парафиновые срезы, окраска гематоксилином и эозином, **Г** – ультратонкий срез.

Оба штамма ВОВ, использованные в данной работе, не оказывали прямого деструктивного действия на ткань опухолевых узлов карциномы Эрлиха. Светооптическое исследование парафиновых срезов опухолевых узлов карциномы Эрлиха мышей, получавших инъекции ВОВ, не выявило увеличения количества опухолевых клеток в состоянии некроза и в состоянии апоптоза. Признаки повреждения кровеносных сосудов в ткани опухолевых узлов карциномы Эрлиха после введения ВОВ также не были обнаружены.

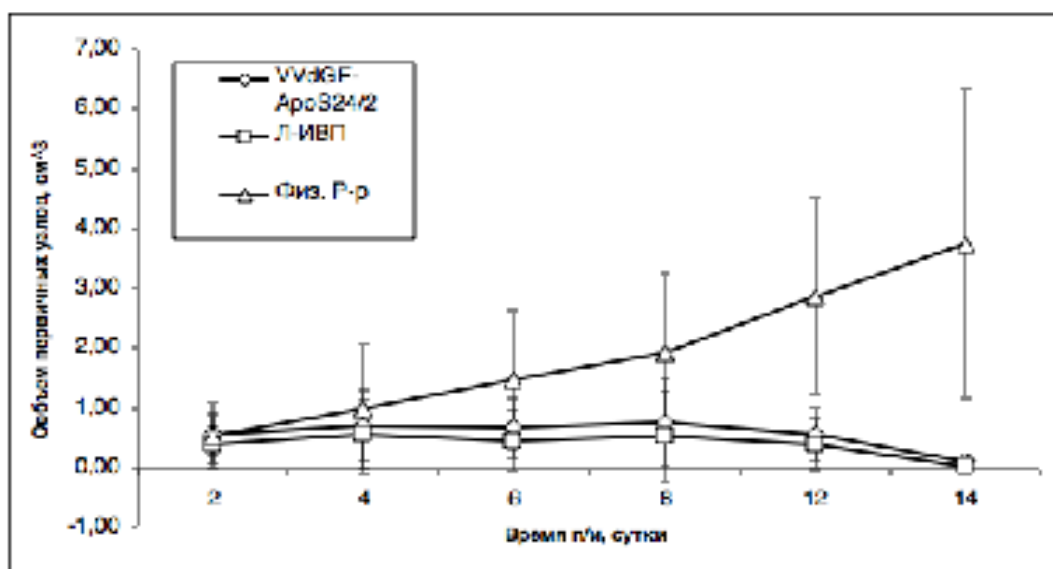


Рисунок 12. График, иллюстрирующий изменение объема опухолевых узлов карциномы Эрлиха, привитой мышам линии C57B1, получавшим интратуморальные инъекции 0,9% раствора NaCl, штаммов Л-ИВП BOB и VVdGF-ApoS24/2 BOB.

Важно отметить, что ни на парафиновых, ни на ультратонких срезах трансплантатов карциномы Эрлиха, не удалось обнаружить признаки размножения BOB в опухолевых клетках. Иммуногистохимическая реакция с антителами, специфично связывающимися с белковым комплексом апоптин-FLAG, не выявила признаков экспрессии белка апоптина в клетках опухолевых узлов карциномы Эрлиха после введения штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB, что говорит либо об отсутствии, либо о чрезвычайно низком уровне репродукции BOB в клетках карциномы Эрлиха. Возможно, что число клеток карциномы Эрлиха, в которых происходила репликация BOB, оказалось ниже уровня чувствительности методов световой и электронной микроскопии. Причиной чрезвычайно низкого уровня репликации BOB в клетках карциномы Эрлиха, очевидно, является тот факт, что мыши - не природные хозяева BOB. Ранее было показано, что BOB плохо размножается в клетках линии SCCF1 карциномы кошки, которые, как и мыши, не являются природными хозяевами BOB. Однако, авторы отмечают, что потомство BOB, полученное из клеток

карциномы кошки SCCF1, сохраняло свои инфекционные свойства (Parviainen et al., 2015).

Определить путем титрования на культуре клеток содержание частиц ВОВ обоих штаммов на единицу объема трансплантатов карциномы Эрлиха у мышей оказалось невозможным из-за структуры опухолевых узлов: они не имели четкой границы, клетки карциномы прорастали между мышечных волокон. Это не позволило иссекать фрагменты опухоли с заданными характеристиками для приготовления гомогената и выявления вируса, равно как и точно определить объем опухолевого узла. Кроме того, было абсолютно неясно, размножается ли ВОВ в клетках карциномы Эрлиха равномерно по объему опухолевых узлов или в каких-то зонах опухоли.

Таким образом, нам не удалось обнаружить прямых доказательств способности штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП размножаться в клетках карциномы Эрлиха, привитой подкожно мышам линии C57Bl, однако противоопухолевый эффект вирусов был четко выражен: объем опухолевых узлов карциномы Эрлиха после введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ уменьшился по сравнению с мышами, получавшими инъекции 0,9% раствора NaCl (рис 12). Мы предположили, что развитие противоопухолевого эффекта ВОВ в отношении карциномы Эрлиха связано с иными механизмами, нежели в случае карциномы A431, когда деструкция опухолевых клеток была прямым следствием размножения вирусов и являлась основной составляющей противоопухолевого эффекта.

Реакция клеток иммунной системы мышей C57Bl с солидной карциномой Эрлиха на интратуморальное введение ВОВ

Мыши линии C57Bl, которым подкожно прививали сингенную карциному Эрлиха и однократно интратуморально вводили штаммы VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ, являются иммунокомпетентными (Bavia et al., 2016). Мы предположили, что интратуморальное введение мышам ВОВ могло привести к активации иммунной системы, эффекторные реакции которой могут быть причиной, или одной из причин замедления роста опухолевых узлов карциномы

Эрлиха по сравнению с мышами контрольной группы. Чтобы проверить это предположение, на парафиновых срезах карциномы Эрлиха, полученных через 2, 4, 8 и 14 сут после введения ВОВ, иммуногистохимически выявляли и подсчитывали количество эффекторных клеток иммунной системы - CD3-положительных Т-лимфоцитов и CD11b-положительных моноцитов и гранулоцитов (Garrido et al., 1997; Grivennikov et al., 2010; Dave et al., 2014). Светооптическое исследование парафиновых срезов, на которых выявляли CD11b-положительные клетки, показало, что моноциты и гранулоциты были локализованы преимущественно на «периферии» опухолевых узлов и в зонах некротической гибели клеток (рис. 13 А, В, Д). Иммуногистохимическая реакция с анти-CD3 антителами выявила очень небольшое количество Т-клеток, локализованных преимущественно в прослойках соединительной ткани, располагавшихся в непосредственной близости от условной границы опухолевых узлов карциномы Эрлиха, привитой мышам линии С57В1 (рис. 13 Б, Г, Е). У мышей, получавших интратуморальные инъекции ВОВ, количество и локализация CD11b-позитивных и CD3-позитивных клеток в ткани опухолевых узлов не отличались от таковых у мышей контрольной группы. Не было найдено и различий количества и локализации CD11b-позитивных и CD3-позитивных клеток у мышей, получавших инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ. Отек и другие морфологические признаки развития воспалительной реакции на парафиновых срезах опухолевых узлов карциномы Эрлиха у мышей, получавших инъекции ВОВ не выявлены. Полученные результаты свидетельствуют, что интратуморальное введение штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ мышам с привитой карциномой Эрлиха не усиливало миграцию эффекторных клеток иммунной системы в опухоль и не приводило к развитию воспалительной реакции в опухолевой ткани. Таким образом, вклад эффекторного звена иммунной системы мышей вследствие размножения ВОВ в клетках опухоли был исключен из числа компонентов наблюдаемого в нашем исследовании противоопухолевого эффекта штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ.

Возможно, что признаки иммунного ответа на введение мышам ВОВ не были обнаружены по причине недостаточной длительности эксперимента. Все мыши были выведены из эксперимента не позднее чем через 14 сут после введения ВОВ. Известно, что противовирусный иммунный ответ является сложным процессом, однако, к 14 сут после введения вируса уже формируются и клеточный, и гуморальный ответы (Garrido et al., 1997; Dave et al., 2014). Возможно, в данном эксперименте развитие эффекторного иммунного ответа было замедлено, поскольку опухолевая ткань, как известно, является иммуносупрессивной средой (De Souza, Bonogino, 2009). Эти обстоятельства с большой долей вероятности могут быть причиной задержки развития иммунного ответа мышей на интрагуморальное введение штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ, однако, можно утверждать, что эффекторные реакции клеток иммунной системы не являются компонентом противоопухолевого эффекта ВОВ, наблюдаемого в наших экспериментах.

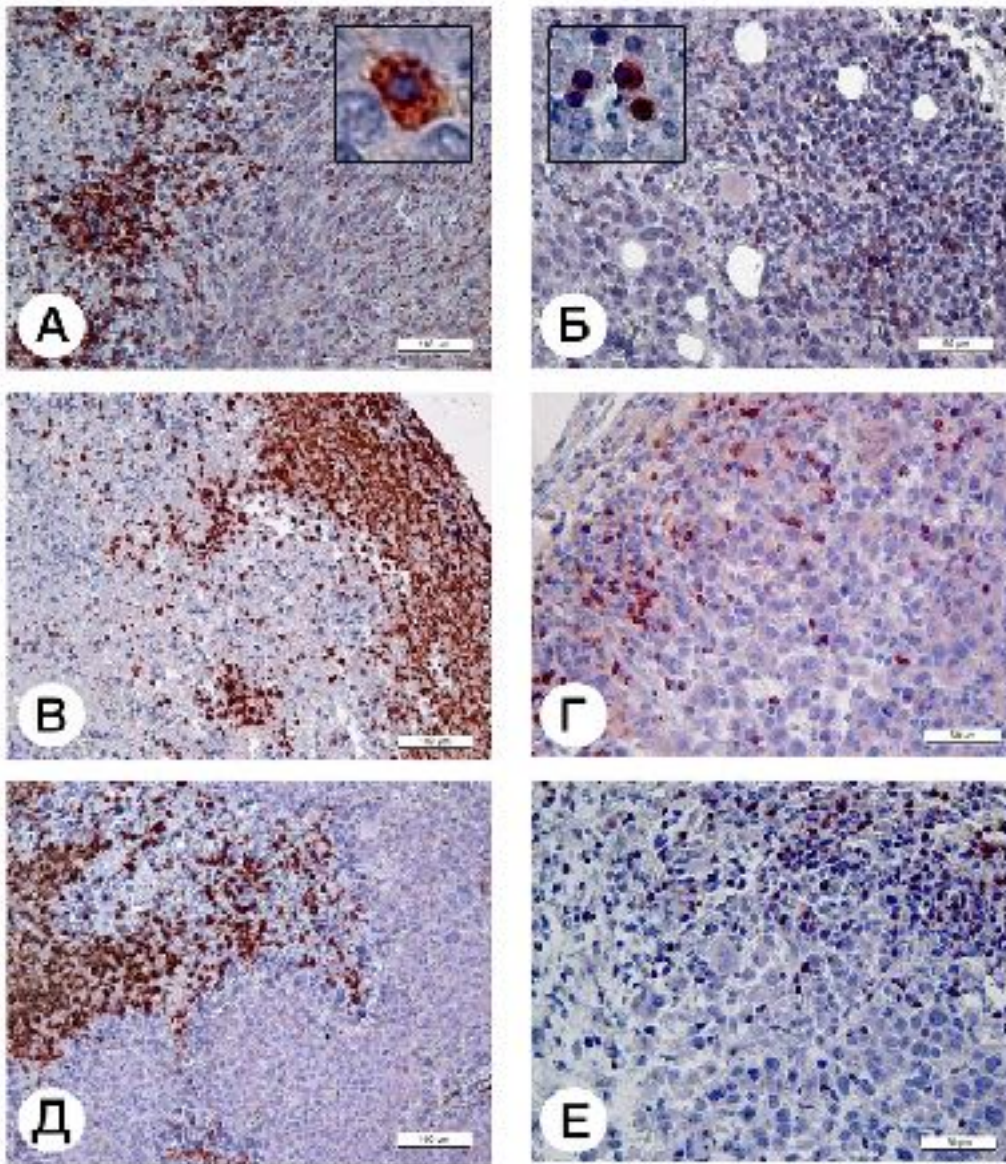


Рисунок 13. Иммуногистохимическое выявление белков CD11b (А, В, Д) и CD3 (Б, Г, Е), маркеров моноцитов, гранулоцитов и Т-клеток, соответственно. На вставках крупным планом показаны CD11b-положительные (А) и CD3-положительные клетки. Парафиновые срезы опухолевых узлов карциномы Эрлиха, привитой мышам линии С57В1. 14 сут после интратуморального введения: А, Б – 0,9% раствора NaCl, В, Г - штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ, Д, Е - штамма Л-ИВП ВОВ. Антигены визуализировали хромогеном АЕС, докраска гематоксилином.

Изменения митотической активности опухолевых клеток после интрамурального введения ВОВ

Способность ВОВ влиять на митотическое деление клеток была обнаружена более 60 лет назад (Kritzler et al., 1949). Мы проанализировали влияние ВОВ на митотическую активность клеток ксенографтов карциномы человека А431 и трансплантатов карциномы Эрлиха.

Визуальная оценка указывала на явное снижение количества клеток в состоянии митоза на срезах опухолевых узлов и карциномы А431, и карциномы Эрлиха у мышей после введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ по сравнению с мышами контрольной группы. Прямой подсчет показал, что однократные интрамуральные инъекции штаммов ВОВ приводят к снижению количества клеток в состоянии митоза на парафиновых срезах карциномы человека А431, привитой мышам nude, по сравнению с инъекциями 0,9% раствора NaCl, через 2 и 4 сут после инъекций (рис 14). Различия между группами мышей были достоверны, $p < 0,05$.

Мы предположили, что снижение пролиферативной активности клеток опухолевых узлов карциномы Эрлиха, привитой мышам, получавшим инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ, может быть причиной замедления роста опухолевых узлов. Однако, особенности строения опухолевых узлов карциномы Эрлиха сделали невозможным корректный подсчет количества опухолевых клеток в состоянии митоза на парафиновых срезах, полученных от мышей различных экспериментальных групп. Отсутствие четких границ опухолевых узлов и распространение опухолевых клеток в мышечную ткань, окружающую опухолевые узлы, не позволили выбрать адекватные участки парафиновых срезов для сравнения у мышей различных экспериментальных групп. Чтобы достичь необходимой точности подсчетов, дальнейшие эксперименты по изучению механизмов противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ проводили на асцитной форме карциномы Эрлиха, привитой в интраперитонеальную полость мышей линии С57В1.

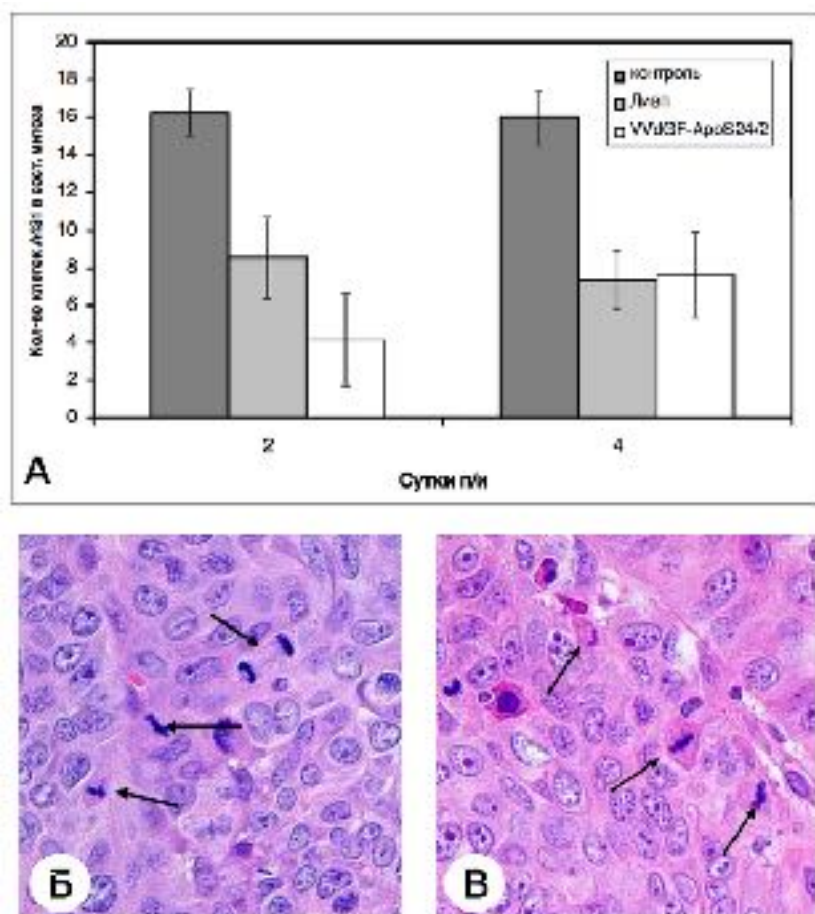


Рисунок 14. А – График, иллюстрирующий среднее количество клеток опухолевых узлов карциномы А431 в состоянии митоза после интратуморальных инъекций 0,9% раствора NaCl и штаммов Л-ИВП и VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. Б, В – Парафиновые срезы опухолевых узлов карциномы А431 через 2 сут после интратуморального введения 0,9% раствора NaCl (Б) и штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ (В). Стрелками показаны клетки ксенографтов в состоянии митоза. Окраска гематоксилином и эозином.

Морфологические характеристики асцитной карциномы Эрлиха

Основной макроскопической характеристикой развития опухоли в перитонеальной полости мышей является длина окружности брюха мышей. Измерения длины окружности брюха мышей линии С57В1 показали, что однократное внутрибрюшинное введение штамма VVdGF-ApoS24/2 приводит к снижению длины окружности брюха у мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха по сравнению с мышами, получавшими инъекции штамма Л-ИВП ВОВ и 0,9% раствора NaCl.

Изучение ультратонких срезов осадков асцитической жидкости, полученной от мышей с асцитной карциномой Эрлиха, показало, что после введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в цитоплазме некоторых клеток карциномы Эрлиха присутствуют локусы зернистой вироплазмы и небольшие скопления зрелых и незрелых частиц ВОВ (рис 15). Это однозначно свидетельствует, что штаммы VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ способны размножаться в клетках карциномы Эрлиха мышей. Морфологические характеристики репликации штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в клетках асцитной формы карциномы Эрлиха в целом не отличались от таковых, наблюдаемых в клетках карциномы А431 *in vivo*. Однако, размеры вирусных фабрик штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в клетках карциномы Эрлиха (1-1,5 мкм) были меньше по сравнению с фабриками, обнаруженными в клетках карциномы А431. Вирусные фабрики штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП в клетках карциномы Эрлиха, как правило, состояли из вироплазмы и нескольких незрелых вирионов, тогда как в клетках карциномы А431 число вирионов было существенно больше. Отдельные зрелые вирусные частицы были разбросаны по цитоплазме клеток карциномы Эрлиха, их количество было невелико. Интересно, что доля «одетых» вирионов среди зрелых частиц штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ оказалась весьма высокой и составляла около 30% (визуальная оценка). Они располагались в периферической части цитоплазмы клеток асцитной карциномы Эрлиха. Около 50% процентов зрелых вирусных частиц имели явные дефекты сборки: нуклеоид и латеральные тельца на ультратонких срезах были электронно-прозрачны.

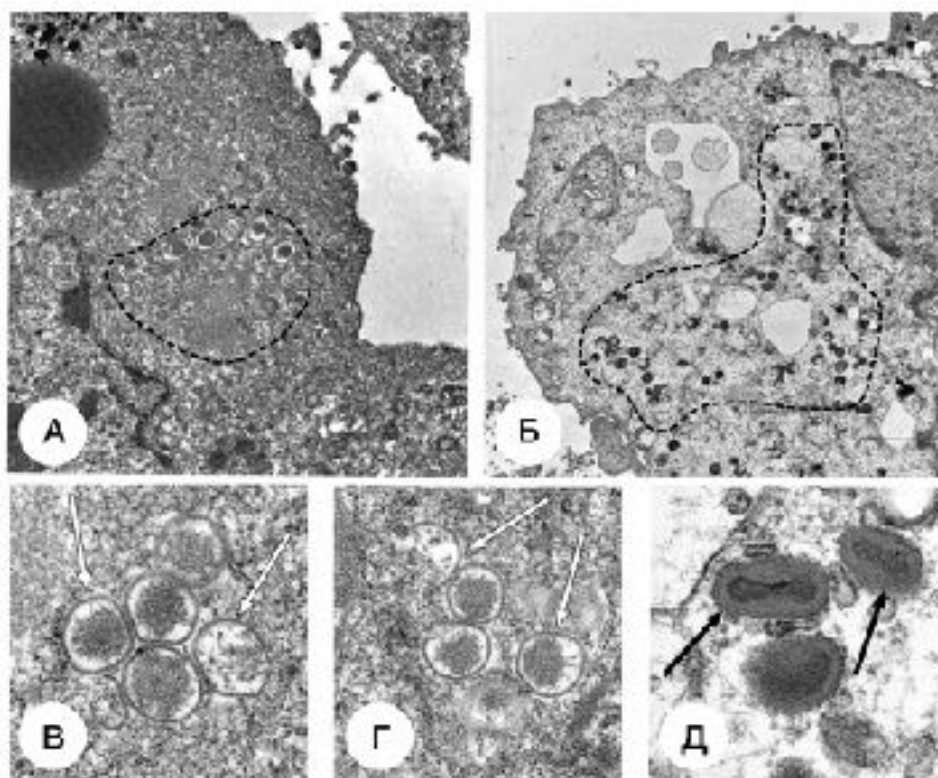


Рисунок 15. Ультратонкие срезы клеток асцитной карциномы Эрлиха, 3 сут после интраперитонеального введения препаратов. А, Г, Д - введение штамма VVdGF-ApoS24/2. Б, В - введение штамма Л-ИВП ВОВ. Пунктирной линией обведены скопления ВОВ в цитоплазме клеток асцитной карциномы Эрлиха. Темными стрелками показаны зрелые частицы ВОВ, светлыми - незрелые частицы ВОВ.

Оценка уровня репликации штаммов ВОВ в клетках асцитной карциномы Эрлиха

Количество клеток асцитной карциномы Эрлиха с морфологическими признаками размножения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ на ультратонких срезах было очень невелико и оценивалось как 1:10 000 клеток. Важно понимать, что оценка количества клеток карциномы Эрлиха, в которых были обнаружены признаки размножения ВОВ, с помощью электронной микроскопии недостаточно точна, поскольку ультратонкий срез позволяет учесть сравнительно небольшое (около 300) количество клеток в одном срезе. Парафиновые срезы охватывают гораздо большее количество клеток и,

соответственно, позволяют провести оценку с большей точностью, по сравнению с ультратонкими срезами. Для однозначной идентификации клеток карциномы Эрлиха, в которых размножается ВОВ, на парафиновых срезах клеточных осадков асцитической жидкости мышей использовали иммуногистохимическое выявление белкового комплекса апоптин-FLAG. Прямой подсчет на парафиновых срезах осадков асцитической жидкости показал, что количество клеток асцитной карциномы Эрлиха, в цитоплазме которых была выявлена позитивная реакция с анти-FLAG антителами (рис 16), было невелико и составляло 4 - 5 : 1000 клеток асцитной карциномы Эрлиха.

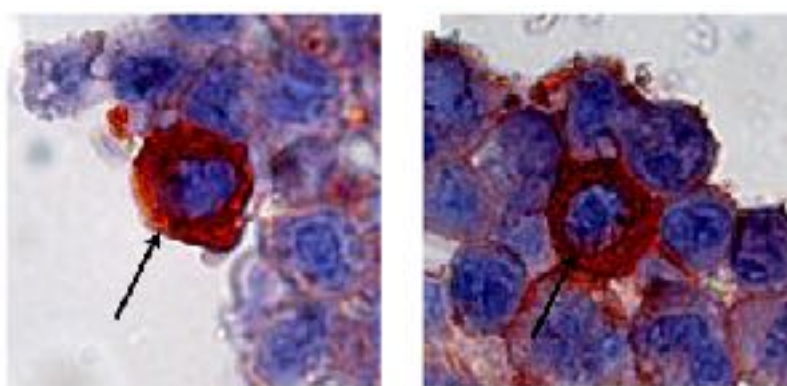


Рисунок 16. Иммуногистохимическое выявление комплекса FLAG-апоптин с помощью анти-FLAG антител. Стрелками показаны клетки, в цитоплазме которых присутствует положительная реакция с анти- FLAG антителами. Парафиновые срезы клеток асцитной карциномы Эрлиха, привитой мышам С57В1. Визуализация антигена хромогеном АЕС, докраска гематоксилином.

Определение содержания вирусных частиц штаммов VVdGF-АроS24/2 и Л-ИВП ВОВ в асцитической жидкости мышей С57В1 методом бляшек на монослое клеток CV-1 также свидетельствовало о низком уровне репродукции ВОВ. У большинства мышей титр вирусных частиц ВОВ не превышал 10^2 - 10^3 БОЕ/мл асцитической жидкости (таблица 2). Количество клеток карциномы Эрлиха в среднем составляло $2 \cdot 10^7$ клеток/мл асцитической жидкости.

Таким образом, результаты титрования и иммуногистохимического анализа указывают на низкий уровень репродукции штаммов VVdGF-АроS24/2

и Л-ИВП ВОВ в клетках карциномы Эрлиха, что, однако, не мешает развитию выраженного противоопухолевого эффекта.

	Титр вируса, БОЕ/мл	
	VVdGF-ApoS24/2 ВОВ	Л-ИВП ВОВ
3 сут. п/в	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$
	$< 10^2$	3×10^2
	$1,5 \times 10^3$	$< 10^2$
6 сут. п/в	$< 10^2$	$1,2 \times 10^4$
	$< 10^2$	$< 10^2$
	$1,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$
9 сут. п/в	$> 10^6$	$2,8 \times 10^4$
	$2,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^2$
	4×10^2	$> 10^5$

Таблица 2. Репродукция штаммов Л-ИВП и VVdGF-ApoS24/2 ВОВ в клетках асцитной формы карциномы Эрлиха (содержание инфекционных вирусных частиц (БОЕ, бляшкообразующие единицы) на миллилитр асцитической жидкости мышей линии С57В1. Титрование проводили на монослое клеток CV-1. п/в – после введения.

Влияние репликации ВОВ на клеточный цикл клеток асцитной карциномы Эрлиха

Чтобы установить, приводит ли репликация ВОВ к снижению пролиферативной активности клеток асцитной карциномы Эрлиха у мышей линии С57В1, подсчитывали количество клеток в состоянии митоза на парафиновых срезах осадков асцитической жидкости. Прямой подсчет выявил значительное снижение количества клеток асцитной карциномы Эрлиха в состоянии митоза после однократного введения штаммов ВОВ по сравнению с

введением 0,9% раствора NaCl (рис. 17А). Различия между экспериментальной и контрольной группами были достоверны, $p < 0,05$. При этом количество клеток карциномы Эрлиха в состоянии митоза после введения мышам штамма VVdGF-ApoS24/2 значительно не отличалось от такового у мышей, получавших инъекции штамма Л-ИВП ВОВ (рис. 17А). Явление блокирования митотического деления клеток вследствие размножения ВОВ было описано довольно давно, с использованием различных штаммов ВОВ и различных линий опухолевых и «нормальных» клеток, что указывает на универсальность механизма блокирования митотического деления штаммами ВОВ, вне зависимости от типа клеток (Kit, Dubbs, 1962; Koziorowska, Wlodarsky, 1966; Groyon, Kniazeff, 1967; Wali, Strayer, 1999). Таким образом, мы наблюдали снижение митотической активности клеток, обусловленное природными свойствами ВОВ, на которое не влияла встройка гена, кодирующего апоптин.

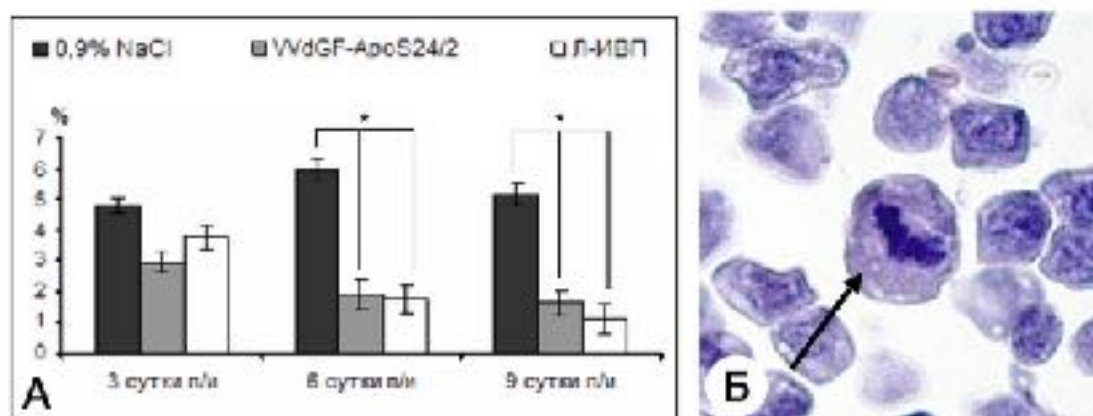


Рисунок 17. А – Количество митотически делящихся клеток асцитной карциномы Эрлиха, привитой мышам С57В1, после интраперитонеального введения 0,9% раствора NaCl, штаммов Л-ИВП и VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. * $p < 0,05$. Б – клетка асцитной карциномы Эрлиха в состоянии митоза (показана стрелкой), 3 сут после введения штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. Парафиновый срез, окраска гематоксилином и эозином.

Для детального изучения механизма влияния штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ на клеточный цикл клеток карциномы Эрлиха мы исследовали экспрессию белка Ki-67, который является маркером клеток, находящихся в

активной фазе клеточного цикла, и белка PCNA, который является маркером S-фазы клеточного цикла (Shönenberger et al., 2015). Решение проанализировать количество клеток карциномы Эрлиха, находящихся именно в S-фазе клеточного цикла, не было случайным. Известно, что некоторые штаммы ВОВ способны ускорять входение клеток в S-фазу клеточного цикла с целью повысить эффективность репликации вирусных частиц на фоне активных синтетических процессов в клетках. Установлено, что это явление связано с гиперфосфорилированием белка p53 ранней киназой В1R вируса, что приводит к снижению активности белка p53 в клетке и усилению синтеза ДНК (Wali, Strayer, 1999; Santos et al., 2004).

Изучение парафиновых срезов осадков асцитической жидкости мышей С57В1 с привитой внутрибрюшинно карциномой Эрлиха показало, что однократные инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ приводили к значительному увеличению количества клеток карциномы Эрлиха, экспрессирующих белки Ki-67 и PCNA, по сравнению с введением 0,9% раствора NaCl (рис. 18). Иными словами, было обнаружено накопление клеток асцитной карциномы Эрлиха, клеточный цикл которых остановился в S-фазе после введения мышам штаммов ВОВ. Количество клеток карциномы Эрлиха, экспрессирующих белки Ki-67 и PCNA на парафиновых срезах осадков асцитической жидкости после введения рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 значительно превышает таковое после введения штамма Л-ИВП ВОВ ($P < 0,05$). Увеличение количества Ki-67- и PCNA-положительных клеток асцитной карциномы Эрлиха вкупе со снижением количества клеток карциномы Эрлиха в состоянии митоза, свидетельствует о «замораживании» клеточного цикла в S-фазе вследствие репликации ВОВ. Статистически значимые различия количества клеток, экспрессирующих белки Ki-67 и PCNA под действием рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ и исходного штамма Л-ИВП ВОВ указывают на способность белка апоптоина оказывать влияние на клеточный цикл асцитной карциномы Эрлиха у мышей линии С57В1. Таким образом, встройка гена, кодирующего апоптин, усиливает эффект

«замораживания» клеточного цикла в S-фазе под влиянием штамма VVdGF-ApoS24/2 по сравнению со штаммом Л-ИВП ВОВ.

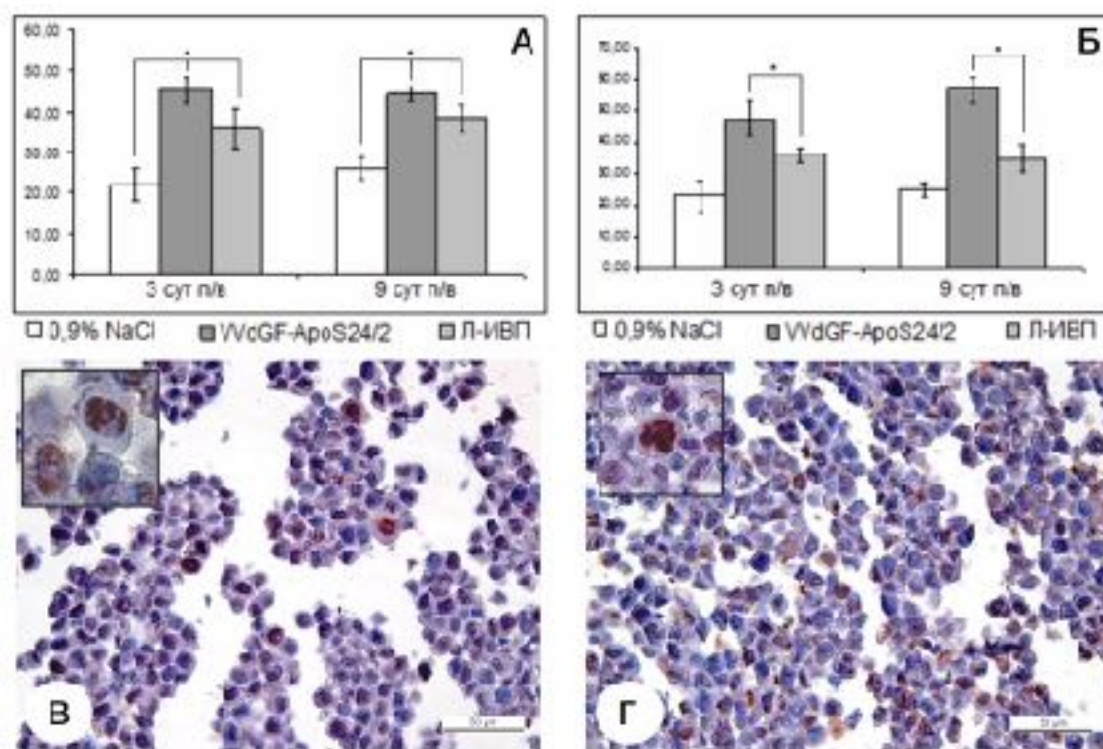


Рисунок 18. А, Б – Графики, иллюстрирующие изменение количества клеток асцитной карциномы Эрлиха, привитой мышам С57В1, экспрессирующих белки Ki-67 и PCNA, после интраперитонеального введения 0,9% раствора NaCl, штамма Л-ИВП ВОВ и штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. Экспрессию белков регистрировали иммуногистохимически на парафиновых срезах. В, Г – иммуногистохимическое выявление белков Ki-67 (В)87 и PCNA (Г) на парафиновых срезах клеток асцитной карциномы Эрлиха через 3 сут после интраперитонеального введения штамма Л-ИВП (В) и VVdGF-ApoS24/2 ВОВ (Г). На врезках показаны позитивно окрашенные клетки при большом увеличении. Визуализация антигенов хромогеном АЕС, докраска гематоксилином.

Принудительный сдвиг клеточного цикла в S-фазу под влиянием реплицирующегося ВОВ был описан в эксперименте с использованием рекомбинантного штамма vTF7-3 ВОВ, которым заражали опухолевые клетки 143В и HeLa *in vitro*. Результаты указывали на существование механизма

контроля клеточного цикла, который включал в себя инактивацию белков p53 и Rb (Yoo et al., 2008). Подобные механизмы сдвига клеточного цикла в S-фазу обеспечивают более эффективную репликацию вирусных частиц и были обнаружены у многих ДНК- и РНК-содержащих вирусов (Bagga, Bouchard, 2014).

Количество Ki-67-позитивных и PCNA-позитивных клеток асцитной карциномы Эрлиха у мышей, получавших инъекции ВОВ, значительно превышало количество клеток, в которых происходила репликация ВОВ. Возможным объяснением этого может быть остановка репликации ВОВ после того, как произошла экспрессия ранних генов ВОВ, в том числе и В1R-киназы (Santos et al., 2004; Yoo et al., 2008) и гена комплекса апоптин-FLAG, который экспрессируется на ранних стадиях репликации ВОВ (Кочнева и др. 2013). Очевидно, что не все инфицированные клетки мышинной карциномы способны поддерживать репликацию ВОВ с формированием видимых в электронном микроскопе структур, в значительной части клеток репродукция вируса «останавливается» на ранних стадиях инфекции, до появления её морфологических признаков.

Известно, что апоптин в клетке циркулирует между ядром и цитоплазмой, взаимодействуя с такими белками как APC1, HSP-70, α -tubulin, β -tubulin и β -actin. Белок APC1, который является субъединицей комплекса APC/C, участвует в регуляции клеточного цикла. Показано, что взаимодействие апоптина и APC1 приводит к нарушению сборки комплекса APC/C и G2/M-аресту клеточного цикла (Teodoro et al., 2004; Wirth et al., 2004; Neilman et al., 2006). Вероятно, что именно это взаимодействие приводило к увеличению количества Ki-67-позитивных и PCNA-позитивных клеток асцитной карциномы Эрлиха после введения рекомбинантного вируса VVdGF-ApoS24/2 по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП.

В настоящее время считается, что в основе противоопухолевого действия онколитических вирусов лежат три основных механизма: прямое разрушение опухолевых клеток реплицирующимся вирусом, вирус-индуцированные

противоопухолевые реакции иммунной системы и вирус-индуцированное разрушение кровеносных сосудов в ткани опухолевого узла (Weibel et al., 2011). Результаты настоящей работы свидетельствуют, что на модели асцитной карциномы Эрлиха, привитой мышам линии C57Bl, при введении рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB не активируется ни один из вышеупомянутых механизмов. В основе противоопухолевого эффекта штамма VVdGF-ApoS24/2 лежит «замораживание» клеточного цикла в S-фазе, которое складывается из природных противоопухолевых свойств BOB и воздействия апоптина на некоторые элементы регуляции клеточного цикла карциномы Эрлиха.

Проведенное исследование реализации противоопухолевых свойств апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 в сравнении с исходным штаммом Л-ИВП BOB показало, что встройка в геном BOB гена белка апоптина и его экспрессия приводят к усилению противоопухолевых свойств BOB на разных экспериментальных моделях (ксенографты карциномы A431 человека и мышьяная карцинома Эрлиха). Эффект усиления не зависит от уровня репродукции вируса и реализуется посредством разных механизмов, в зависимости от происхождения опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Репликация онколитических вирусов в опухолевых клетках, приводящая к их гибели, является важной составляющей их противоопухолевого действия (Al et al., 2015), это в полной мере относится и к ВОВ. Исследование ультратонких срезов показало, что штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ активно размножается в клетках ксенографтов карциномы А431 человека, формируя морфологически зрелые вирионы и оказывая деструктивное действие на опухолевые клетки. Уровень репликации рекомбинантного штамма вируса в клетках карциномы А431 был несколько ниже по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП ВОВ, что, очевидно, обусловлено искусственной делецией гена *C11R*, который важен для репликации ортопоксвирусов (Martin et al., 2012; Kochneva et al., 2013). Проведенное исследование свидетельствует, что в случае ксенографтов карциномы человека основным компонентом противоопухолевого эффекта ВОВ является тотальная гибель опухолевых клеток вследствие размножения вируса. Напротив, в клетках карциномы Эрлиха мышей уровень репликации обоих штаммов ВОВ был крайне низок. Так, в препаратах асцитной карциномы Эрлиха число клеток с морфологическими признаками инфекции составляло около 1: 10 000 по данным электронной микроскопии и 4 - 5: 1000 по данным иммуногистохимического анализа. Размножение ВОВ удалось зарегистрировать лишь в клетках асцитной формы карциномы Эрлиха методами биотитрования и электронной микроскопии. В клетках солидной карциномы Эрлиха обнаружить признаки репликации ВОВ на ультратонких срезах и с помощью иммуногистохимического анализа не удалось, возможно, не только из-за малого числа клеток с морфологическими признаками инфекции, но и из-за их неравномерного распространения в опухоли. Метод биотитрования оказался неприменим из-за особенностей роста трансплантатов, не позволивших приготовить гомогенаты опухоли требуемого качества. Выявленные яркие различия уровня репликации рекомбинантного штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в опухолевых клетках мышей и человека, очевидно, связаны с фактором хозяина, поскольку мыши не являются природными хозяевами ВОВ.

Несмотря на очевидные различия уровня репликации апоптин-продуцирующего штамма в клетках опухолей разного происхождения, штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ продемонстрировал выраженное противоопухолевое действие, его однократное интратуморальное введение приводило к заметному снижению объема и ксенографтов карциномы А431 человека у мышей nude, и трансплантатов мышинной карциномы Эрлиха у мышей С57В1, по сравнению с введением 0,9% раствора NaCl. Различия четко проявлялись через 16 сут после введения рекомбинантного ВОВ в ксенографты карциномы А431, и через 12 сут после введения данного вируса в трансплантаты карциномы Эрлиха. Эти данные указывают на сложный механизм противоопухолевого эффекта, в реализации которого роль прямого деструктивного действия вируса может не быть ведущей.

Проапоптотический белок апоптин избирательно вызывает апоптоз опухолевых клеток различного происхождения (Tavassoli et al., 2005; Los et al., 2009; Zhou et al., 2012). Однако, результаты проведенного нами исследования показали, что в рекомбинантной системе на основе штамма Л-ИВП ВОВ данный эффект не реализуется. Возможно, это связано с локализацией апоптина в цитоплазме опухолевых клеток, показанной иммуногистохимически на срезах ксенографтов карциномы А431 и трансплантатов карциномы Эрлиха, в которых размножался рекомбинантный штамм VVdGF-ApoS24/2. Известно, что локализация апоптина в ядрах опухолевых клеток является необходимым условием индукции апоптоза (Los et al., 2008). Таким образом, ожидаемый проапоптотический эффект рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма ВОВ не был получен на экспериментальных моделях, использованных в данной работе. Принимая во внимание, что клетки карциномы А431 имеют человеческое происхождение, следует признать, что экспрессируемый в составе рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ апоптин не обладает способностью индуцировать апоптоз опухолевых клеток человека.

Одновременно с этим, нами был обнаружен ранее не описанный эффект, связанный с локализацией апоптина в цитоплазме клеток солидной карциномы А431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24/2: формирование крупных

скоплений актиновых и промежуточных филаментов. Скопления филаментов наблюдались и на парафиновых, и на ультратонких срезах опухолевых узлов через 36 и 55 сут после введения вируса мышам. В результате экспрессии апоптоина и связанного с ним накопления филаментов цитоскелета изменился механизм разрушения ткани опухолевых узлов: они «усыхали», напоминая «мумии», и не содержали большого количества жидкости, в отличие от узлов, в которые вводили исходный штамм Л-ИВП. Таким образом, противоопухолевый эффект рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ при введении вируса в ксенографты карциномы А31 человека складывался из двух основных компонентов: прямой деструкции опухолевых клеток размножающимся вирусом и «усыханием» опухоли вследствие накопления апоптоина в цитоплазме клеток. Очевидно, что визуальное наблюдение и прямое измерение размеров опухолевых узлов на мышах, используемое авторами исследований эффективности новых препаратов, не может выявить изменений, наблюдаемых в микроскопе, что лишний раз подтверждает необходимость микроскопического анализа при изучении лечебного эффекта того или иного препарата.

Противоопухолевое действие рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ на трансплантаты карциномы Эрлиха мышей наблюдалось в случае и солидной, и асцитной форм: объемы опухолей достоверно уменьшались по сравнению с контролем. Однако, изучение морфологической картины показало, что, в отличие от ксенографтов карциномы А431, клетки которой, в первую очередь, погибали вследствие прямого деструктивного действия вируса, гибель клеток карциномы Эрлиха после введения вируса не происходила. В качестве других составляющих противоопухолевого эффекта вирусов рассматриваются эффекторные реакции иммунной системы и повреждение кровеносных сосудов опухоли (Weibel et al., 2011). Иммуногистохимический анализ маркеров эффекторных клеток иммунной системы (CD3 и CD11b) не выявил признаков накопления Т-лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов в ткани опухоли, что указывает на отсутствие реакции иммунной системы на опухолевые клетки и позволяет исключить данный механизм из числа обеспечивающих противоопухолевый эффект ВОВ в использованных экспериментальных

системах. Не были обнаружены и деструктивные изменения кровеносных сосудов опухоли, способные внести вклад в развитие противоопухолевого эффекта.

Визуальный анализ гистологических срезов трансплантатов карциномы Эрлиха после введения ВОВ показал подавление митотической активности опухолевых клеток по сравнению с контролем, однако, особенности строения опухоли не позволили провести количественную оценку числа клеток в состоянии митоза. Чтобы решить эту задачу, мы использовали асцитную форму карциномы Эрлиха.

Иммуногистохимическое выявление соответствующих маркеров (Ki-67 и PCNA) на парафиновых срезах клеток асцитной карциномы Эрлиха обнаружило «замирание» клеточного цикла в S-фазе после интратуморального введения ВОВ мышам, которое, соответственно, могло приводить к замедлению роста опухоли. Данный эффект ВОВ описан и другими авторами (Bagga, Bouchard, 2014). Количество клеток асцитной карциномы Эрлиха, «замерших» в S-фазе клеточного цикла после введения рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 статистически значимо превышало таковое после введения штамма Л-ИВП. Следовательно, апоптин усиливает вирусный эффект «замирания» клеточного цикла в S-фазе. Однако, не ясно, обладает ли апоптин «самостоятельной» способностью вызывать «замирание» клеточного цикла, которое складывается с аналогичным эффектом ВОВ, или лишь усиливает тормозящее действие ВОВ. Таким образом, «замирание» клеточного цикла в S-фазе оказалось основным механизмом противоопухолевого эффекта, апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ в отношении мышинной карциномы Эрлиха.

Проведенное исследование противоопухолевых свойств рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2, продуцирующего проапоптотический белок апоптин, в сравнении с исходным штаммом Л-ИВП ВОВ выявило отчетливое усиление противоопухолевого эффекта рекомбинантного вируса, а также различные варианты его реализации в опухолевых клетках разного видового происхождения: карциномы А431 человека и карциномы Эрлиха мышей.

Следует отметить, что наблюдаемое противоопухолевое действие штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB на оба вида карцином не было связано с эффекторными реакциями клеточного звена иммунной системы. Интересно, что проапоптотический эффект апоптина не был реализован ни в одной экспериментальной системе, что говорит о сложном характере механизмов противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB.

Полученные результаты позволяют утверждать, что рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 BOB может выступать основой для создания эффективного препарата для лечения злокачественных заболеваний человека и животных.

ВЫВОДЫ

1. Рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 BOB активно реплицируется в клетках ксенографтов карциномы A431 человека у мышей nude, и очень слабо - в клетках асцитной карциномы Эрлиха мышей. Репликация штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB сопровождается формированием морфологически полноценных вирионов.

2. Онколитический эффект рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 при введении в ксенографты карциномы A431 и трансплантаты карциномы Эрлиха у мышей не уступает эффекту исходного штамма Л-ИВП BOB, несмотря на аттенуацию и сниженный уровень репликации рекомбинантного штамма.

3. Обнаружен ранее не описанный механизм противоопухолевого действия рекомбинантного штамма BOB – «остановка» клеточного цикла в S-фазе, приводящий к замедлению роста карциномы Эрлиха после введения штамма VVdGF-ApoS24/2. Основной составляющей онколитического действия штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB на ксенографты карциномы A431 человека у мышей nude является деструкция опухолевых клеток вследствие репродукции вируса.

4. Экспрессия апоптоина выявляется в цитоплазме опухолевых клеток, инфицированных штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB. Встройка трансгена апоптоина в геном штамма Л-ИВП BOB:

- не увеличивает частоту встречаемости апоптоза в клетках инфицированных ксенографтов карциномы A431 человека и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей;
- изменяет характер разрушения клеток карциномы A431, на месте которых в поздние сроки после введения вируса (35-55 сут) локализуются скопления филаментозных структур и небольшое количество клеточного детрита, отсутствует экссудат;
- значительно снижает митотическую активность клеток ксенографтов карциномы A431 и трансплантатов карциномы Эрлиха, а также усиливает остановку в S-фазе клеточного цикла клеток трансплантатов карциномы Эрлиха.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А., Ким И.И., Фатюхина О.Е., Шишкина Л.Н., Богрянцева М.П., Плясунов И.В., Святченко В.А., Киселев Н.Н., Колокольцова Т.Д., Рябчикова Е.И., Сергеев А.Н., Нетесов С.В. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата Канцеролизин //Вопр. Вирусол. - 2006. Т. 51. - №6. - С. 39-42.
2. Вирусология в 3-х томах /под ред. Б. Филдса, Д. Найпа. - М.: Мир. -1989.
3. Кочнева Г. В., Бабкина И. Н., Лупан Т. А. и др. Апоптин усиливает онколитическую активность вируса осповакцины *in vitro*. //Молекулярная биология. - 2013. - Т.47. -№5. - С.842–852.
4. Нетёсов С.В., Кочнева Г.В., Локтев В.Б., Святченко В.А., Сергеев А.Н., Терновой В.А., Тикунова Н.В., Шишкина Л.Н., Чумаков П.М. Онколитические вирусы: достижения и проблемы //Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария. - 2011. - №3. - С.26-31.
5. Патогенные для человека ортопоксвирусы /Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. /КМК Scientific Press Ltd. - 1998.
6. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха: методическая разработка /Инжеваткин Е.В. / Красноярский государственный университет. – Красноярск. - 2004. - 10 с.
7. Серпинский О.И., Кочнева Г.В., Урманов И.Х. и др. Конструирование рекомбинантных вариантов ортопоксвирусов путем встройки чужеродных генов в межгенный промежуток вирусного генома. //Молекулярная биология. - 1996. - №30. - С.1064–1073.
8. Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G. et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: Evidence from intracranial gliomas //Proc Natl Acad Sci USA. - 2000. - Т.97. - №23. - С.12846-51.
9. Al Y.C., Zhang Z., Alusi G. et al. Vaccinia virus, a promising new therapeutic agent for pancreatic cancer //Immunotherapy. - 2015. - Т.7. - №12. - С.1249-1258.

10. Alanazi I., Ebrahimie E., Hoffmann P., Adelson D.L. Combined gene expression and proteomic analysis of EGF induced apoptosis in A431 cells suggests multiple pathways trigger apoptosis //Apoptosis. - 2013. - T. 18. - №11. - C.1291-1305.
11. Bagga S., Bouchard M.J. Cell cycle regulation during viral infection // Methods Mol. Biol. - 2014. - №1170. - C.165–227.
12. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity //Nature. - 1998. - T.392. - №6673. - C.245-252.
13. Barnett F.H. Selective delivery of herpes virus vectors to experimental brain tumors using RMP-7 //Cancer gene therapy. - 1999. - №6. - C.14–20.
14. Bhatt R., de Vries P., Tulinsky J. et al. Synthesis and in vivo antitumor activity of poly(L-glutamic acid) conjugates of 20S-camptothecin //J Med Chem,. - 2003. - T.46. - №1. - C.190-193.
15. Bavia L., de Castro Í.A., Cogliati B., Dettoni J.B., Alves V.A., Isaac L. Complement C5 controls liver lipid profile, promotes liver homeostasis and inflammation in C57BL/6 genetic background //Immunobiology. - 2016. - T.221. - №7. -C.822-32.
16. Bierman H.R., Crile D.M., Dod K.S. et al. Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia //Cancer. - 1953. - T.6. - №3. - C.591-605.
17. Braun N., Paradopoulos T., Muller-Hermelink H.K. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells //Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. - 1988. - T.56. - C.25–33.
18. Breitbach C.J., Arulanandam R., De Silva N. et al. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans //Cancer Res. - 2013. - T.73. - №4. - C.1265-75.
19. Brignone C., Grygar C., Marcu M. et al. A soluble form of lymphocyte activation gene-3 (IMP321) induces activation of a large range of human effector cytotoxic cells //J. Immunol. - 2007. - T.179. - №6. - C.4202-11.

20. Brunet J.F, Denizot F., Luciani M.F. et al. A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4 //Nature. - 1987. - T.328. - №6127. - C. 267-270.

21. Buller R.M., Chakrabarti S., Cooper J.A. et al. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence //J Virol. - 1988. - T.62. - №3. - C.866-74.

22. Burek M, Maddika S, Burek CJ, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Los M. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent //Oncogene. - 2006. - №25. - C.2213–2222.

23. Chan W.M., McFadden G. Oncolytic Poxviruses //Annu Rev Virol. - 2014. - T.1. - №1. - C.119–141.

24. Chen Z. Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy //Trends Mol Med. - 2010. - T.16. - №12. - C.594–602.

25. Ciavarella S., Dominici M., Dammacco F. et al. Mesenchymal stem cells: a new promise in anticancer therapy //Stem Cells Dev. - 2011. - T.20. - №1. - C. 1-10.

26. Clarke G., Johnston S., Corrie P. et al. Withdrawal of anticancer therapy in advanced disease: a systematic literature review //BMC Cancer. - 2015. - T.15. - №892.

27. D'Errico G., Machado H.L., Sainz B. Jr. A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet //Clin. Transl. Med. - 2017. - T.6. - №1. -C.3.

28. Danen-Van Oorschot A.A., Fischer D.F., Grimbergen J.M. et al. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. - №94. - C.5843–5847.

29. Danen-Van Oorschot A.A., Zhang Y.H., Leliveld S.R. et al. Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis //J. Biol. Chem. - 2003. - №278. - C.27729–27736.

30. Dave R.V., Jebar A.H.S., Jennings V.A., Adair R.A., West E.J., Errington-Mais F. Toogood G.J., Melcher A.A. Viral warfare! Front-line defence and arming

the immune system against cancer using oncolytic vaccinia and other viruses // Surgeon. - 2014. - №12. - C.210–220.

31. De Souza A.P., Bonorino C. Tumor immunosuppressive environment: Effects on tumor-specific and nontumor antigen immune responses. *Expert Rev // Anticancer Ther.* - 2009. - №9. - C.1317–1332.

32. Delaney G., Jacob S7, Featherstone C. et al. The Role of Radiotherapy in Cancer Treatment. Estimating Optimal Utilization from a Review of Evidence-Based Clinical Guidelines // *Cancer.* - 2005. - №104. -C.6.

33. DeVita V.T. Jr., Chu E. A History of Cancer Therapy // *Cancer Res.* - 2008. - T.68. - №21.

34. Donat U., Weibel S., Hess M. Preferential Colonization of Metastases by Oncolytic Vaccinia Virus Strain GLV-1h68 in a Human PC-3 Prostate Cancer Model in Nude Mice // *PLoS One.* - 2012. - T.7. - №9. - C.45942.

35. Dufour F, Sasseville A.M., Chabaud S. et al. The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNF α - and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8 // *Apoptosis.* - 2011. - T.16. - №3. - C.256-71.

36. Ebert O., Shinozaki K., Kournioti C. et al. Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer // *Cancer Res.* - 2004. - T.647 - №9. - C.3265–3270.

37. Elankumaran S, Rockemann D, Samal S.K. Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death // *J Virol.* - 2006. - T.80. - №15. - C.7522-34.

38. Eto Y., Yoshioka Y., Mukai Y. et al. Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand // *Int J Pharm.* - 2008. - №354. - C.3–8.

39. Fábíán Z., Töröcsik B., Kiss K. et al. Induction of apoptosis by a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in PC12 rat pheochromocytoma cells // *Anticancer Res.* - 2001. - T.21. - №1A. - C.125-35.

40. Fang J.Y., Al-Suwayeh S.A. Nanoparticles as delivery carriers for anticancer prodrugs // *Exprt Opin Drug Deliv.* - 2012. - T.9. - №6. - C.657-69.

41. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect // *Adv Drug Deliv Rev.* - 2011. - №63. - C.136–151.

42. Fenner F., Henderson D., Arita I. et al. Smallpox and Its Eradication: докл. World Health Organization. - Geneva, Switzerland, 1988. - C.539–593.

43. Fisher K.D., Seymour L.W. HEMA copolymers for masking and retargeting of therapeutic viruses // *Adv Drug Deliv Rev.* - 2010. - №62. - C.240–245.

44. Franks H.A., Wang Q., Patel P.M. New Anticancer Immunotherapies // *Anticancer Research.* - 2012. - №32. - C.2439-2454.

45. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn // *Cancer Sci.* - 2016. - T.107. - №10. - C.1373-1379.

46. Galmarini D., Galmarini C.M., Galmarini F.C. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history // *Critical Reviews in Oncology/ Hematology.* - 2012. - №84. - C.181-199.

47. Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez-Villar J.J., Lopez-Botet M., Duggan-Keen M., Stern, P.L. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours // *Immunol. Today.* - 1997. - №18. - C.89–95.

48. Gentschev I., Adelfinger M., Josupeit R. et al. Preclinical Evaluation of Oncolytic Vaccinia Virus for Therapy of Canine Soft Tissue Sarcoma // *PLoS One.* - 2012. - T.7. - №5. - C.37239.

49. Gerdes J., Lemke H., Baisch H. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 // *J Immunol.* - 1984. - T.4. - C.1710–1715.

50. Gozuacik D., Yagci-Acar H.F., Akkoc Y. et al. Anticancer use of nanoparticles as nucleic acid carriers // *J Biomed Nanotechnol.* - 2014. - T.10. - №9. - C.1751-83.

51. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer // *Cell.* - 2010. - №140. - C.883–899.

52. Groyon R.M., Kniazeff A.J. Vaccinia virus infection of synchronized pig kidney cells // *J. Virol.* - 1967. - №1. - C.1255–1264.

53. Hashizume H. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness //Am J Pathol. - 2000. - №156. - C.1363–1380.

54. He S., Li P., Chen C.H. et al. Effective oncolytic vaccinia therapy for human sarcomas //J Surg Res. - 2012. - T175. - №2. - C.53-60.

55. Heilman D.W., Teodoro J.G., Green M.R., Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies //J. Virol. - 2006. - T.80. - №15. - C.7535–7545.

56. Huang H.S., Liu Z.M., Ding L., Chang W.C., Hsu P.Y., Wang S.H., Chi C.C., Chuang C.H. Opposite effect of ERK1/2 and JNK on p53-independent p21WAF1/CIP1 activation involved in the arsenic trioxide-induced human epidermoid carcinoma A431 cellular cytotoxicity //J Biomed Sci. - 2006. - T.13. - №1. - C.113-125.

57. Huebner R.J., Bell J.A., Rowe W.P. et al. Studies of adenoidal-pharyngeal-conjunctival vaccines in volunteers //Journal of the American Medical Association. - 1955. - T.159. - №10. - C.986-989.

58. Hulou M.M., Cho C.F., Chiocca E.A., Bjerkvig R. Experimental therapies: gene therapies and oncolytic viruses //Handb Clin Neurol. - 2016. - №134. - C. 183-197.

59. Hunter T. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib //The Journal of Clinical Investigation. - 2011. - T.117. - №8.

60. Ikeda K. Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses //Nature medicine. - 1999. - №5. - C.881–887.

61. Ikeda K. Complement depletion facilitates the infection of multiple brain tumors by an intravascular, replication-conditional herpes simplex virus mutant //J Virol. - 2000. - №74. - C.4765–4775.

62. Jacquin J.P., Chargari C., Thorin J. et al. Phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin in combination with gemcitabine in metastatic breast cancer patients //Am J Clin Oncol. - 2012. - T.35. - №1. - C.18-21.

63. Jamieson A.T. Induction of both thymidine and deoxycytidine kinase activity by herpes viruses //J Gen Virol. - 1974. - T.24. - №87. - C.465–480.

64. Janke M., Peeters B., de Leeuw O. et al. Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy //Gene Ther. - 2007. - T.14. - №23. - C.1639–1649.

65. Jin K., Teng L., Shen Y., He K., Xu Z., Li G. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review //Clin Transl Oncol. - 2010. - T.12. - №7. - C.473-80.

66. Kanerva, A., Nokisalmi, P., Diaconu I. et al. Antiviral and antitumor T-cell immunity in patients treated with GM-CSF-coding oncolytic adenovirus Clin. Cancer Res. - 2013. - №19. - C.2734–2744.

67. Karshieva S. S., Krasikova L.S., Belyavskii A.V. Mesenchymal Stem Cells as Tool for Antitumor Therapy //Mol Biol (Mosk). - 2013. - T.47. - №1. - C.50-60.

68. Kelly E., Russell S.J. History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering //Molecular Therapy. - 2007. - T.15. - №4. - C.651–659.

69. Kelly E.J., Russell S.J. MicroRNAs and the regulation of vector tropism //Mol Ther. - 2009. - №17. - C.409–416.

70. Kim M. Replicating poxviruses for human cancer therapy //J. Microbiol. - 2015. - №53. - C.209–218.

71. Kit S., Dubbs D.R. Biochemistry of vaccinia-infected mouse fibroblasts (strain L-M). II. Properties of the chromosomal DNA of infected cells //Virology. - 1962. - №18. - C.286–293.

72. Knepper T.C., Saller J., Walko C.M. Novel and Expanded Oncology Drug Approvals of 2016-PART 1: New Options in Solid Tumor Management //Oncology (Williston Park). - 2017. - T.15. - №31. - C.110-121.

73. Kozirowska J., Wlodarsky K. The effects of crude preparations of vaccinia virus on mitosis and DNA synthesis of KB cells //J. Exp. Med. - 1966. - №124. - C.199–208.

74. Kritzler, R.A.; Mulliken, B.; Turner, J.C. Histological appearance of mouse sarcoma 180 infected by vaccinia virus //Cancer Res. - 1949. - №9. - C.74–75.

75. Leliveld S.R., Dame R.T., Mommaas M.A. et al. Apoptin protein multimers form distinct higher-order nucleoprotein complexes with DNA //Nucleic Acids Res. - 2003. - №31. - C.4805–4813.

76. Leliveld S.R., Zhang Y.H., Rohn J.L. et al. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer //J. Biol. Chem. - 2003. - №278. - C.9042–9051.

77. Li X., Ningyi J., Zhiqiang M. et al. Antitumor effects of a recombinant fowlpox virus expressing Apoptin in vivo and in vitro //Int J Cancer. - 2006. - №119. - C.2948–2957.

78. Li Q., Zhang H., Tan C. et al. AdHu5-apoptin induces G2/M arrest and apoptosis in p53-mutated human gastric cancer SGC-7901 cells //Tumor Biol. - 2013. - №34. - C.3569–3577.

79. Liskova J., Knitlova J., Honner R., Melkova Z. Apoptosis and necrosis in vaccinia virus-infected HeLa G and BSC-40 cells //Virus Res. - 2011. - №160. - C. 40–50.

80. Liu L., Cooper T., Howley P.M., Hayball J.D. From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation //Viruses. - 2014. - T.6. - №10. - C. 3787-3808.

81. Los M., Panigrahi S., Rashedi I. et al. Apoptin, a tumor-selective killer // Biochimica et Biophysica Acta. - 2009. - №1793. - C.1335–1342.

82. Lun X., Chan J., Zhou H. et al. Efficacy and safety/toxicity study of recombinant vaccinia virus JX-594 in two immunocompetent animal models of glioma //Mol Ther. - 2010. - T.18. - №11. - C.1927-36.

83. MacTavish H., Diallo J.S., Huang B. et al. Enhancement of vaccinia virus based oncolysis with histone deacetylase inhibitors //PLoS One. - 2010. - T.5. - №12. - C.14462.

84. Margiotta A., Bucci C. Role of Intermediate Filaments in Vesicular Traffic //Cells. - 2016. - T.5. - №2.

85. Mark R. Buller L., Palumbo G.J. Poxvirus Pathogenesis //Microbiol. Rev. - 1991. - №55. - C.80–122.

86. Markman M. Pegylated liposoman doxorubicin in the treatment of cancers of the breast and ovary //Expert Opin Pharmacoter. - 2006. - T.7. - №11. - C. 1469-74.

87. Martin S., Harris D.T., Shisler J. The C11R gene, which encodes the vaccinia virus growth factor, is partially responsible for MVA-induced NF- κ B and ERK2 activation //J Virol. - 2012. - T.86. - №18. - C.9629-9639.

88. Martuza R.L., Malick A., Markert J.M. et al. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant //Science. - 1991. - №252. - C.854–856.

89. McFadden G. Poxvirus tropism //Nat. Rev. Microbiol. - 2005. - №3. - C. 201–213.

90. Minton J.P. Mumps Virus and BSG Vaccine in metastatic melanoma //Arch Surg. - 1973. - T.106. - №4. - C.503-506.

91. Moolten, F.L., Wells J.M., Heyman R.A. et al. Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene //Hum Gene Ther. - 1990. - T.1. - №86. - C.125–134.

92. Moore A.E. The destructive effects of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180 //Cancer. - 1949. - T.2. - №38. - C.525–534.

93. Moore A.E. Effects of viruses on tumors //Annu Rev Microbiol. - 1954. - №8. - C.393–410.

94. Moore A. Viruses with oncolytic properties and their adaptation in tumours //Ann N Y Acad Sci USA. - 1952. - №54. - C.945–952.

95. Morrison W.B. Cancer Chemotherapy: An Annotated History //J. Vet. Intern. Med. - 2010. - №24. - C.1249–1262.

96. Moss, B. Poxvirus entry and membrane fusion //Virology. - 2006. - №344. - C.48–54.

97. Naik S., Russell S.J. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways //Expert Opin Biol Ther. - 2009. - №9. - C.1163–1176.

98. Natesan S., Kataria J.M., Dhama K. et al. Anti-neoplastic effect of chicken anemia virus VP3 protein (apoptin) in Rous sarcoma virus-induced tumours in chicken //J. Gen. Virol. - 2006. - №87. - C.2933–2940.

99. Noteborn M.H., de Boer G.F., van Roozelaar D.J. et al. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle //J. Virol. - 1991. - №65. - C.3131–3139.

100. Oro C., Jans D.A. The tumour specific pro-apoptotic factor apoptin (Vp3) from chicken anaemia virus //Curr Drug Targets. - 2004. - T.5. - №2. - C.179-190.

101. Parato K.A., Breitbach C.J., Le Boeuf F. et al. The Oncolytic Poxvirus JX-594 Selectively Replicates in and Destroys Cancer Cells Driven by Genetic Pathways Commonly Activated in Cancers //Mol Ther. - 2012. - T.20. - №4. - C. 749–758.

102. Parviainen, S., Autio, K., Vähä-Koskela, M., Guse, K., Pesonen, S., Rosol, T.J., et al., Incomplete but infectious vaccinia virions are produced in the absence of oncolysis in feline SCCF1 cells //PLoS One. - 2015. - T.10. - №3.

103. Pippa G.C., Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects //Medicine. - 2011. - T.39. - №12.

104. Pezzilli R., Partelli S., Cannizzaro R. et al., Ki-67 prognostic and therapeutic decision driven marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNENs): A systematic review //Adv Med Sci. - T.61. - №1. - C.147-153.

105. Ploubidou A., Way M. Viral transport and the cytoskeleton //Curr Opin Cell Biol. - 2001. - T.13. - C.97–105.

106. Pol J., Bloy N., Obrist F. et al. Trial Watch:: Oncolytic viruses for cancer therapy //Oncoimmunology. - 2014. - №3.

107. Richards K.H., Macdonald A. Putting the brakes on the anti-viral response: negative regulators of type I interferon (IFN) production //Microbes Infect. - 2011. - T.13. - №4. - C.291–302.

108. Rosenthal E., Poizot-Martin I., Saint-Marc T. et al. Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma //Am J Clin Oncol. - 2002. - T.25. - №1. - C.57-9.

109. Rothmann T., Hengstermann A., Whitaker N.J., et al. Replication of ONYX-015, a Potential Anticancer Adenovirus, Is Independent of p53 Status in Tumor Cells //J Virol. - 1998. - T.72, - №12. - C.9470–9478.

110. Rottner K., Strada T.E. Poxviruses taking a ride on actin: new users of known hardware //Cell Host Microbe. - 2009. - T.6. - C.497–499.

111. Rundqvist H., Johnson R.S. Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis //J Intern Med. - 2013. - T.274. - №2. - C.105-112.

112. Russel S.J., Peng K., Bell J.C. Oncolytic virotherapy //Nat Biotechnol. - 2008. - T.30. - №7. - C.658–670.

113. Sabbatini P., Aghajanian C., Dizon D. et al. Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma //J Clin Oncol. - 2004. - T.22. - №22. - C.4523-31.

114. Santos C.R., Vega F.M., Blanco S., Barcia R., Lazo P.A. The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism //J. Virol. - 2004. - №328. - C.254–265.

115. Schirmacher V., Bai L., Umansky V. et al. Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity //Int J Oncol. - 2000. - T. - 16. - №2. - C.363–373.

116. Seledtsov V.I., Goncharova A.G., Seledtsova G.V. Multiple-purpose immunotherapy for cancer //Biomedicine & Pharmacotherapy. - 2015. - №76. - C. 24–29.

117. Sheen M.R., Lizotte P.H., Toraya-Brown S. et al. Stimulating antitumor immunity with nanoparticles //Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol,. - 2014. - T.6. - №5. - C.496-505.

118. Shönenberger F., Deutzmann A., Ferrando-May E., Merhof D. Discrimination of cell cycle phases in PCNA-immunolabeled cells //BMC Bioinform. - 2015. - №16.

119. Song C, Honmou O, Ohsawa N. et al. Effect of Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Mice Infected with Prions //Journal of Virology. - 2009. - T.83. - №11. - C.5918–5927.

120. Southam C.M., Moore A.E. West Nile, Ilheus, and Bunyamwera virus infections in man //Am G Trop Med Hyg. - 1951. - T.31. - №6. - C.724-741.
121. Smith G., Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25,000 base pairs of foreign DNA //Gene. - 1983. - T.25. - №1. - C.21-28.
122. Speir R.W., Southam C.M. Interference of Newcastle disease virus with neuropathogenicity of oncolytic viruses in mice //Ann N Y Acad Sci. - 1960. - №83. - C.551–563.
123. Staff N.P., Grisold A., Grisold W., Windebank A.J. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Current Review //Ann Neurol. - 2017.
124. Still G.F. On a Form of chronic joint disease in children //Med Chir Trans. - 1987. - №80. - C.47-69.
125. Tavassoli M., Guelen L., Luxon B.A., et al. Apoptin: Specific killer of tumor cells? //Apoptosis. - 2005. - T.10. - №4. - C.717–724.
126. Teodoro J.G., Heilman D.W., Parker A.E. et al. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53 //Genes Dev. - 2004. - T.18. - №16. - C.1952–1957.
127. Urruticoechea A., Alemany R., Balart J. et al. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview //Current Pharmaceutical Design. - 2010. - №16. - C.3-10.
128. Uusi-Kerttula H., Hulin-Curtis S., Davies J. et al. Oncolytic Adenovirus: Strategies and Insights for Vector Design and Immuno-Oncolytic Applications //Viruses. - T.7. - №11. - C.6009-6042.
129. Vassilev L., Ranki T., Joensuu T. et al. Repeated intratumoral administration of ONCOS-102 leads to systemic antitumor CD8 T-cell response and robust cellular and transcriptional immune activation at tumor site in a patient with ovarian cancer //Oncoimmunology. - 2015. - №4.
130. Vigil A., Park M.S., Martinez O., et al. Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus //Cancer Res. - 2007. - T.67. - №17. - C.8285–8292.
131. Wakimoto H. The complement response against an oncolytic virus is species-specific in its activation pathways //Mol Ther. - 2002. - №5. - C.275–282.

132. Wali A., Strayer D.S. Comparative effects of virulent and avirulent poxviruses on cell cycle progression //Exp. Mol. Pathol. - 1999. - №66. - C.31–38.

133. Wang L., Gao S., Jiang W., Luo C., Xu M., Bohlin L., Rosendahl M., Huang W. Antioxidative dietary compounds modulate gene expression associated with apoptosis, DNA repair, inhibition of cell proliferation and migration //Int J Mol Sci. - T.15. - №9. - C.16226-16245.

134. Wang C., Wang W., Wang J. et al. Apoptin induces apoptosis in nude mice allograft model of human bladder cancer by altering multiple bladder tumor-associated gene expression profiles //Tumour Biol. - 2013. - №34. - C.1667–1678.

135. Weibel S., Raab V., Yu Y.A., Worschech A., Wang E., Marincola F.M., et al., Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection //BMC Cancer. - 2011. - №11.

136. Whilding L.M., Archibald K.M., Kulbe H., Balkwill F.R., Oberg D., McNeish I.A. Vaccinia Virus Induces Programmed Necrosis in Ovarian Cancer Cells //Molecular Therapy. - 2013. - №21. - C.2074–2086.

137. Wilden H., Fournier P., Zawatzky R. et al. Expression of RIG-I, IRF3, IFN-beta and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus //Int J Oncol. - 2009. - T.34. - №4. - C.971–982.

138. Wirth K.G., Ricci R., Giménez-Abián J.F., Taghy-beeglu S., Kudo N.R., Jochum W., et al., Loss of the anaphase-promoting complex in quiescent cells causes unscheduled hepatocyte proliferation //Genes Dev. - 2004. - T.18. - №1. - C. 88–98.

139. World Cancer Report. - 2014.

140. Wu Y., Zhang X., Wang X. et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of Newcastle disease virus //Intervirol. - 2012. - T.55. - №4. - C. 276-86.

141. Ye F., Zhong B., Dan G. et al. Therapeutic anti-tumor effect of exogenous apoptin driven by human surviving gene promoter in a lentiviral construct //Arch Med Sci. - 2013. - №9. - C.561–568.

142. Yoo N., Pyo C., Kim Y., Ahn B., Choi S. Vaccinia virus-mediated cell cycle alteration involves inactivation of tumour suppressors associated with Brfl and TBP //Cell. Microbiol. - 2008. - №10. - C.583–592.

143. Yu Z., Li S., Brader P. et al. Oncolytic vaccinia therapy of squamous cell carcinoma //Mol Cancer. - 2009. - T.6. - №8. - C.45.

144. Zamarin D, Palese P. Oncolytic Newcastle Disease Virus for cancer therapy: old challenges and new directions //Future Microbiol. -2012. - T.7. - №3. - C.347-67.

145. Zeh H.J., Bartlett D.L. Development of a replication-selective, oncolytic poxvirus for the treatment of human cancers //Cancer Gene Ther. - 2002. - T.9. - №12. - C.1001-12.

146. Zeyauallah M., Patro M., Ahmad I. et al. Oncolytic Viruses in the Treatment of Cancer: A Review of Current Strategies //Pathol. Oncol. Res. - 2012. - №18. - C.771–781.

147. Zhang Q., Yu Y.A., Wang E. et al. Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus //Cancer Res. - 2007. - T.67. - №20. - C.10038-10046.

148. Zhou S., Zhang M., Zhang J. et al. Mechanisms of Apoptin-induced cell death //Med Oncol. - 2012. - №29. - C.2985–2991.

149. Zhu Y., Liao L. Applications of nanoparticles for anticancer drug delivery: A review //J Nanosci Nanotechnol. - 2015. - T.15. - №7. - C.4753-73.