

На правах рукописи

ЮРЧЕНКО
Ксения Сергеевна

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПОТЕНЦИАЛА ДИКИХ ШТАММОВ ВИРУСА
БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА И НА МОДЕЛИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОНКОГЕНЕЗА *IN VIVO***

03.02.02 - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Научный руководитель:

Шестопалов Александр Михайлович, заведующий Отделом экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», доктор биологических наук (06.02.02), профессор.

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита состоится «__» _____ 2019 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ "Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева" Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 499 15 00; e-mail: office@influenza.spb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ "Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева" Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17); <http://www.influenza.spb.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на интенсивное развитие методов молекулярной и клеточной биологии и способов ранней диагностики и комплексной терапии злокачественных новообразований, наблюдается неуклонный рост в динамике выявляемости и смертности населения от онкологических болезней. В связи с этим разработку принципиально новых и совершенствование существующих методов комплексного лечения злокачественных новообразований, основанных на внедрении новейших технологий и достижений в современной и клинической онкологии, является одной из наиболее актуальных задач современной медицины.

На сегодняшний день основными методами онкотерапии по-прежнему остаются традиционное хирургическое удаление опухоли, применение химиотерапевтических препаратов и лучевая терапия, которые далеко не всегда достигают высокоэффективных результатов, имеют зачастую локальное воздействие и в случаях с развитием метастазов остаются малоэффективными (Ravindra, 2009).

В последние годы большие надежды возлагаются на разработку таргетных подходов терапии опухолей, среди которых виротерапия - экспериментальный способ лечения злокачественных новообразований, использующий для селективного лизиса опухолевых клеток либо генетически-модифицированные инфекционные агенты, либо вирусы, проявляющие природные онколитические свойства (Tedcastle, 2012). В пользу целесообразности применения виротерапии для лечения злокачественных новообразований говорит селективная и эффективная репликация вирусов преимущественно в неопластических клетках с минимальной токсичностью для нормальных здоровых тканей, уничтожение трансформированных клеток и распространение вирусного потомства на соседние опухолевые клетки. Кроме того помимо непосредственного лизиса раковых клеток онколитические вирусы способны вызывать активацию иммунного ответа организма посредством стимулирования выработки интерферонов и фактора некроза опухоли. Действие некоторых вирусов способно повышать чувствительность опухолевой ткани к химио- и лучевой терапии (Wennier, 2012; Zhao, 2016), что может привести к впечатляющим результатам в результате применения виротерапии в комбинации со стандартным лечением, включая хирургическое удаление солидного узла.

Среди широкого разнообразия онколитических вирусов вероятным кандидатом в поиске эффективного агента для виротерапии является вирус болезни Ньюкасла (семейство *Paramyxoviridae*, род *Avulavirus*). Вирус болезни Ньюкасла не патогенен для человека и, являясь вирусом птиц и вызывая у них высоко контагиозное заболевание, обуславливает отсутствие иммунитета у человека к этому вирусу.

В научной литературе можно найти достаточно подробные данные о строении вируса болезни Ньюкасла, механизме попадания в клетку и репликации. Описаны результаты взаимодействия литических и нелитических штаммов ВБН в доклинических испытаниях на разных культурах опухолевых и нормальных клеток млекопитающих. В ряде экспериментов демонстрируется способность ВБН избирательно лизировать трансформированные клетки при экспериментальном онкогенезе на модели *in vivo*. Показано, что различные штаммы ВБН могут отличаться по своим биологическим эффектам, причем это зависит не только от особенностей данного вирусного штамма, но и от культуры опухолевых клеток, на которую осуществляется воздействие (НИИ, 2018а).

За последние десятилетия некоторые вакцинные аттенуированные селекцией штаммы ВБН прошли несколько фаз клинических испытаний в США, Канаде, Китае и странах Европы. Они продемонстрировали безопасность исследуемых штаммов для человека и способность подавлять развитие опухолей и продлевать жизнь опухолевых больных. Однако противоопухолевый эффект исследуемых препаратов на основе ВБН в клинических испытаниях оказывается значительно ниже ожидаемого результата, что возможно связано с использованием в качестве онколитических агентов преимущественно аттенуированных селекцией и рекомбинантных штаммов ВБН. Считается, что одним из способов повышения онколитических

свойств является отказ от излишней аттенуации и использование природных штаммов ВБН. На территории Российской Федерации подобными разработками противоопухолевых виротерапевтических препаратов занимаются единичные группы исследователей.

Таким образом, опираясь на имеющиеся результаты литературных данных об использовании ВБН в качестве противоопухолевого агента, тенденции роста числа разработок в области виротерапии в мире, проведение поиска онколитических изолятов ВБН и исследования противоопухолевого потенциала на опухолевых клетках в системе *in vitro* и *in vivo* становится актуально на территории РФ.

Анализ жизнеспособности раковых клеток *in vitro* после инфицирования штаммами ВБН позволяет выявить наличие онколитического потенциала и особенности его проявления на опухолевых клеточных линиях различной этиологии и гистогенеза. Использование микроскопических методов, является необходимым условием для выявления структурных изменений в опухолевой ткани после виротерапии *in vivo*.

Степень разработанности проблемы

В литературе исследование онколитических вирусов разных таксономических видов, в том числе вируса болезни Ньюкасла, описано в ряде научно-исследовательских работ, подавляющее большинство которых посвящено рекомбинантным, аттенуированным и вакцинным штаммам и лишь небольшая часть работ посвящена оценке онколитических свойств природных диких штаммов. Между тем онколитический потенциал штаммов ВБН, циркулирующих с дикими мигрирующими птицами на территории Российской Федерации (РФ), остается малоизучен, что делает перспективным и актуальным исследование противоопухолевых свойств природных изолятов ВБН.

Автор опирался на работы таких зарубежных ученых как Alexander D.J., Breitbach C.J., Cassel W.A., Dortmans J.S., Fournier P., Ravindra P.V., Schirmacher V., Weinberg R.A., Zamarin D. и других. Изучению онколитических свойств природных штаммов ВБН в значительной мере способствовали результаты работ российских ученых: Кешелава В.В., Корчагина К.В., Красильникова А.А., Нетесов С.В., Подольская М.В., Шестопалова Л.В. Данная работа является логическим продолжением предшествующих совместных работ сотрудников кафедры физиологии НГУ и отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний НИИЭКМ ФИЦ ФТМ по исследованию онколитических свойств штаммов ВБН на линиях опухолевых клеток человека. В трудах этих ученых представлены результаты пилотных исследований и рассматривается противоопухолевая активность только двух штаммов из коллекции. Однако оценка противоопухолевого онколитического потенциала большой коллекции вирусов позволяет выбрать штамм с наиболее выраженными природными онколитическими свойствами. Кроме того скрининг эффективности цитолитического действия природных штаммов ВБН на опухолевых клеточных линиях человека и далее на мышинной модели экспериментального онкогенеза представляет уникальное исследование для РФ, а подобные работы в мире единичны. Таким образом, поиск противоопухолевого вирусного агента с высокими природными онколитическими свойствами и проверка эффективности в системах *in vitro* и *in vivo* обусловили цель и задачи данного диссертационного исследования

Цель и задачи исследования

Актуальная цель настоящего исследования заключается в изучении противоопухолевого потенциала природных штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от диких мигрирующих птиц на территории РФ, на модели *in vitro* и при экспериментальном онкогенезе *in vivo*.

Достижение поставленной цели потребовало решения следующих задач:

1. Провести первичный скрининг цитотоксического действия штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от диких мигрирующих птиц на территории Российской Федерации, в отношении опухолевых клеток человека и выявить штаммы, обладающие наиболее эффективными онколитическими свойствами.

2. Оценить противоопухолевую активность вируса болезни Ньюкасла с наиболее выраженными цитолитическими свойствами при интратуморальной виротерапии мышинной карциномы Кребс-2 на экспериментальной модели *in vivo*.

3. Изучить динамику опухолевой прогрессии и характер морфологических изменений в опухолевой ткани карциномы Кребс-2 у мышей после курса виротерапии методами световой микроскопии.

4. Количественно оценить кровеносные сосуды и микроциркуляторное русло в опухолевой ткани у мышей с карциномой Кребс-2 после курса интратуморальной виротерапии вирусом болезни Ньюкасла при помощи подсчета CD34-позитивно окрашенных клеток, а также определить экспрессию VEGFR в опухолевой ткани иммуногистохимическим методом с последующим анализом влияния виротерапии на ангиогенез опухолевой ткани.

Научная новизна работы

Впервые проведено развернутое исследование по оценке цитотоксических свойств коллекции диких штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных из природных резервуаров, в отношении опухолевых клеточных линий человека (HCT116+/, HeLa, A549 и MCF7). Получены данные о наличии уникальных онколитических свойств у природных не аттенуированных и не адаптированных штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от диких мигрирующих птиц на территории Российской Федерации.

В результате проведенной работы выбран природный голубиный штамм ВБН NDV/Altai/pigeon/770/2011, обладающий выраженным онколитическим потенциалом в отношении опухолевых клеток человека.

Впервые описано влияние серии интратуморальных инъекций природного мезогенного штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на опухолевую прогрессию карциномы Кребс-2 на иммунокомпетентных мышах.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказана безопасность штамма для нормальных здоровых клеток, исследована динамика изменения прогрессии опухолевого процесса после курса виротерапии природным штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011, что наряду с динамикой изменений продукции сосудистых факторов позволило сделать вывод о наличии антинеоангиогенных свойств вируса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе работы современные данные о наличии онколитического потенциала у изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от диких мигрирующих птиц на территории Российской Федерации, могут быть использованы для дальнейших исследований и разработок виротерапевтических препаратов, направленных на борьбу с онкологическими заболеваниями (патент №2562115 «Штамм вируса болезни Ньюкасла для изучения онколитических свойств и механизмов онколизиса для создания прототипного противоопухолевого препарата»).

Исследования показали наличие способности у дикого природного штамма вируса болезни Ньюкасла не только напрямую убивать опухолевые клетки, но и участвовать в торможении опухолевой прогрессии посредством ингибирования кровоснабжения опухоли. Полученные результаты можно учитывать в разработке эффективных методов антиангиогенно-цитотоксической терапии злокачественных новообразований, чьи рост и метастазирование напрямую зависят от интенсивности васкуляризации опухолевой ткани.

Полученные в работе данные могут быть использованы при подготовке лекционных и практических занятий курсов вирусологии.

Два штамма вируса болезни Ньюкасла с выраженными онколитическими свойствами приняты на депонирование в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского» Минздрава России. По результатам работы получен патент №2562115 «Штамм вируса болезни Ньюкасла для изучения онколитических свойств и механизмов онколизиса для создания прототипного противоопухолевого препарата».

Методология и методы исследования

В данной работе применялись вирусологические методы (выделение вируса в системе РКЭ, серологические методы (постановка реакции гемагглютинации, реакции торможения

гемагглютинации), титрование вирус-содержащего материала на клеточной культуре Vero), методы клеточной биологии (культивирование клеточных линий, оценка жизнеспособности клеток, иммуноцитохимическое окрашивание), гистологические методы (обзорное окрашивание препаратов и иммуногистохимическое выявление маркеров на парафиновых срезах), методы световой и флуоресцентной микроскопии, а также морфометрический анализ. Исследования проводились на базе Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины - структурное подразделение ФИЦ ФТМ. Используемые в работе методы позволяют получить представление о наличии цитолитических свойств у природных штаммов вируса болезни Ньюкасла и демонстрируют логически выстроенное исследование, направленное на отбор природного штамма с наиболее выраженным онколитическим эффектом на опухолевых клетках человека с доказательством противоопухолевых свойств на животной модели при экспериментальном онкогенезе.

Положения, выносимые на защиту

1. Природные штаммы вируса болезни Ньюкасла NDV/mallard/Amur/264/2009, NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010, NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010, NDV/Altai/pigeon/770/2011, NDV/Yakutiya/mallard/852/2011 и NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2010, выделенные на территории Российской Федерации, обладают наиболее выраженным онколитическим эффектом в отношении опухолевых клеточных линий карциномы толстой кишки HCT116+/, карциномы шейки матки HeLa, немелкоклеточной карциномы легкого A549, и безопасны для мононуклеаров периферической крови условно здоровых доноров *in vitro*. Наиболее выраженный противоопухолевый потенциал на исследуемых опухолевых клеточных линиях демонстрирует мезогенный штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011, выделенный от сизого голубя, будучи безопасным для здоровых клеток человека.

2. Серия однократных интратуморальных инъекций в течение четырех суток природным штаммом вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 способна сдерживать рост опухолевого узла на животной модели экспериментального онкогенеза с привитой внутримышечно мышшиной карциномой Кребс-2.

3. Интратуморальная виротерапия штаммом вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 мышшиной карциномы Кребс-2 *in vivo* в течение четырех суток сопровождается структурными изменениями опухолевой ткани за счет появления некрозоподобных структур и проявления антиангиогенных свойств вируса, что способствует развитию ишемии внутри опухоли.

Степень достоверности и апробация работы

Работа выполнена с применением широкого ряда методов исследования, адекватно подобранного на основании поставленных задач. Основные результаты диссертационной работы доложены на Восьмой международной конференции «8th International conference on Oncolytic Virus Therapeutics» (Оксфорд, Великобритания, 2014), Девятой конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева (Томск, 2014), Первой Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2014), Девятой международной конференции «9th International conference on Oncolytic Virus Therapeutics» (Бостон, Соединенные Штаты Америки, 2015), Международной конференции EMBO «Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk» (Томск, 2015), Международной конференции «5 Heidelberg Forum for young life scientists» (Гейдельберг, Германия, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 работы, в том числе в 7 статьях, 14 тезисах и 3 патентах; 4 печатных работы опубликованы в ведущих российских научных журналах, рекомендованных ВАК Минобразования и науки Российской Федерации и в 3 международных журналах, а также в трудах международных конференций.

Личный вклад автора

Планирование экспериментов, анализ материалов, использованных в диссертационной работе, написание статей осуществлялось лично автором. Все эксперименты, включая наработку

изолятов вируса болезни Ньюкасла, титрование штаммов вируса, культуральная работа с перевиваемыми и первичными клеточными линиями и исследование онколитических свойств на опухолевых клеточных культурах человека, работа с лабораторными животными, проведение иммуноцитохимического окрашивания, иммунизация животных для наработки антител к белкам вируса болезни Ньюкасла, гистологические исследования, обработка полученных результатов выполнены автором лично. Культуральная работа с опухолевыми клеточными линиями, иммуноцитохимическое окрашивание клеток и организация взаимодействия с ИЦиГ СО РАН проходила при участии к.б.н. Губановой Н.В. Нарботка антител к вирусу болезни Ньюкасла и уход за лабораторными животными осуществлялся при участии Глущенко А.В. Общее руководство работой осуществлялось д.б.н., проф. Шестопаловым А.М.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста, включает главы введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложения.

Диссертация иллюстрирована 6 таблицами и 40 рисунками. Список литературы включает 290 источников, в том числе 17 отечественных и 273 работы иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы вирусов и их наработка для проведения исследований. Коллекция из 44 штаммов вируса болезни Ньюкасла была сформирована в рамках проведения мониторинга вируса птичьего гриппа в пределах миграционных маршрутов диких птиц на территории Сибири и Дальнего Востока в период с 2008 по 2014 гг. Изоляты ВБН были выделены из клоакальных смывов и фрагментов кишечника, полученных от диких мигрирующих птиц, преимущественно отряда Гусеобразные. Птицы отлавливались общепринятыми методами с помощью паутинных сетей, а также учитывались во время сезонной спортивной охоты в осенние периоды 2008-2014 годов. Изоляты ВБН были выделены из собранных проб согласно стандартной методике путем инокуляции в аллантаоисную полость 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) в соответствии со стандартными процедурами из рекомендаций ВОЗ (WHO, 2011). Первичная идентификация изолированного вируса болезни Ньюкасла осуществляли методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в закрытой пробирке в режиме реального времени с использованием праймеров и зонда, специфичных к консервативным участкам М-гена вируса болезни Ньюкасла, согласно Mia Kim, 2008. В тестах на патогенность (MDT и ICPI) определяли патотипы штаммов. Полученные ВСЖ центрифугировали на низких оборотах для удаления крупного дебриса, проводили через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, проверяли гемагглютинирующий титр в реакции РГА и титровали для определения IgTCID₅₀/мл.

Клетки. Титрование изолятов ВБН проводили на перевиваемой культуре клеточной линии Vero (эпителий почки африканской зеленой мартышки (*Chlorocebus aethiops*)). Культура была получена из банка клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (пос. Кольцово, Новосибирская область, Россия). Клетки Vero культивировали в среде ДМЕМ с 10%-ной сывороткой плодов коровы и 60 мкг/мл гентамицина сульфата при температуре 37°C и в атмосфере с 5% содержанием CO₂.

Для определения цитолитических свойств природных изолятов ВБН в работе были использованы следующие перевиваемые опухолевые клеточные линии человека: карцинома толстой кишки HCT116+/, полученная из банка клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (пос. Кольцово, Новосибирская область, Россия), аденокарцинома молочной железы MCF7, полученная из коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), эпидермоидная карцинома шейки матки HeLa, любезно предоставленная сотрудниками НИИ клинической и экспериментальной лимфологии (Новосибирск, Россия), немелкоклеточная карцинома легкого A549, любезно предоставленная к.м.н. Белогородцевым С.Н. (Клиника иммунопатологии НИИФКИ (Новосибирск, Россия)).

Опухолевые культуры клеток HCT116, HELA и A549 культивировались в среде DMEM (Gibco, Великобритания) с 10%-ной сывороткой плодов коровы и 60 мкг/мл гентамицина сульфата при температуре 37°C и в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Клеточная линия MCF7 культивировалась в среде MEM (Gibco, Великобритания) с 10%-ной сывороткой плодов коровы и 60 мкг/мл гентамицина сульфата при температуре 37°C и в атмосфере с 5% содержанием CO₂.

В качестве контроля безопасности ВБН для здоровых нетрансформированных клеток использовали мононуклеарные клетки периферической крови человека (МНПК), выделенные из крови условно здоровых доноров с помощью метода седиментации в градиенте плотности фикола. Мононуклеары периферической крови культивировали в среде RPMI («БиолоТ», Россия) с 10%-ной сывороткой плодов коровы и 60 мкг/мл гентамицина сульфата при температуре 37°C и в атмосфере с 5% содержанием CO₂.

Лабораторные животные и используемая опухолевая модель. В работе использовали 7-8 недельных мышей линии BALB/c, полученных из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Животных содержали по 5-10 особей в стандартных пластиковых клетках при обычном световом режиме в условиях стандартного рациона со свободным доступом к пище и воде. Период адаптации животных к условиям содержания перед началом эксперимента составил одну неделю. Из эксперимента животных выводили путем дислокации позвонков в шейном отделе. Для экспериментов использовали перевиваемый штамм асцитной карциномы Кребс-2, любезно предоставленный с.н.с. лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦиГ СО РАН к.б.н. Поповой Н.А. Штамм Кребс-2 поддерживали путем регулярного пассирования на мышах. При внутримышечной прививке в область бедра образуется солидный узел. Метастазов опухоль не дает.

Титрование вируса. Титрование вируса болезни Ньюкасла в культуре клеток Vero проводили по следующей схеме: клеточную суспензию рассеивали на 96-луночные культуральные планшеты в концентрации 30,000 клеток на лунку. В качестве ростовой среды использовали питательную среду для культур клеток DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки коров и раствора гентамицина сульфата в концентрации 60 мкг/мл. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C.

Готовили 10-кратные разведения имеющегося пула вируса на поддерживающей среде MEM с добавлением 1% фетальной сыворотки коров, начиная с разведения 10⁸(-1). Планшеты с суточным монослоем клеток отмывали раствором Хенкса и вносили разведения вируса в объеме 100 мкл в лунку, используя 8 лунок на разведение. Планшеты инкубировали в инкубаторе с температурой 37°C и подачей 5% CO₂ в течение 1 часа для адсорбции вируса, затем содержимое лунок удаляли и вносили в каждую лунку по 200 мкл поддерживающей среды. Планшеты инкубировали в инкубаторе с температурой 37°C и подачей 5% CO₂. Ежедневно под микроскопом контролировали состояние монослоя клеток на наличие ЦПД. Окончательный учет титрования проводили на 5-е сутки.

Определение жизнеспособности опухолевых клеток человека после инфицирования штаммами вируса болезни Ньюкасла колориметрическим методом (МТТ-тест).

Жизнеспособность клеток всех опухолевых линий человека определяли с помощью МТТ-теста. Для оценки цитопатического эффекта штаммов ВБН клетки высевали в ростовой среде на 96-луночные планшеты в концентрации 30,000 клеток/лунку и инкубировали при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Через 24 часа клеточный монослой отмывали раствором Хенкса и инкубировали с разведениями вируса: 2, 8 и 16 ГАЕ на 10,000 клеток. Разведения вируса готовили в ростовой среде MEM с расчетом 100 мкл объема на лунку. Клетки в 8 лунках на каждое разведение инкубировали с вирусом в течение 1 часа 30 минут при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Контрольные опухолевые клетки без вируса инкубировали в ростовой среде. По истечении времени инкубации меняли среду на поддерживающую Игла-MEM («БиолоТ») из расчета 200 мкл среды на лунку. Ежедневно под микроскопом контролировали состояние монослоя клеток на наличие ЦПД.

На 4 сутки оценивали жизнеспособность клеток колориметрическим методом. МТТ разводили в ФСБ до концентрации 0,5 мг/мл. 10%-ный рабочий раствор МТТ готовили на

основе поддерживающей среды. Клетки на 96-луночных планшетах отмывали раствором Хенкса. Рабочий раствор МТТ добавляли в объеме 100 мкл в лунку, после чего клетки с МТТ инкубировали 4 часа в тех же условиях. Затем удаляли среду и добавляли по 150 мкл ДМСО на лунку и инкубировали в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 нм и 630 нм (фон) на микропланшетном фотометре Lonza Biotek ELX808 Absorbance Microplate Reader (USA). Процент живых клеток рассчитывали по формуле: $(\text{Э}540-\text{Э}630)/(\text{К}540-\text{К}630)\times 100\%$, где Э – показатели, полученные из зараженных вирусом лунок, а К – показатели контрольных лунок. На основании полученных результатов жизнеспособности опухолевых клеток после инфицирования оценивали цитолитический потенциал штаммов.

Определение жизнеспособности суспензионных клеточных культур мононуклеаров периферической крови человека и асцитной карциномы Кребс-2 под действием вируса болезни Ньюкасла колориметрическим методом. Для оценки жизнеспособности после инфицирования вирусом болезни Ньюкасла суспензионные культуры мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК), полученных от условно здоровых доноров, и асцитной мышины карциномы Кребс-2 были заражены штаммами ВБН. Для этого суспензию клеток МНПК в ростовой среде RPMI-1640 и Кребс-2 в ростовой среде ДМЕМ распределяли по микропробиркам типа Эппендорф. Клетки концентрировали центрифугированием 1500g 5 минут, удаляли супернатант и инкубировали с разными разведениями вируса: 2, 8, 16 и 32 ГАЕ/10 000 клеток. Разведения вируса готовили в соответствующих ростовых средах RPMI-1640 и ДМЕМ. Клетки с вирусом инкубировали в течение 1 часа 30 минут при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂, затем клетки концентрировали центрифугированием 1500g 5 минут, удаляли супернатант с вирусом, а клеточный осадок ресуспендировали в свежей ростовой среде, после чего распределяли по лункам на 96-луночном планшете в концентрации 10,000 клеток в 100 мкл на лунку. Контрольные необработанные вирусом клетки инкубировали в ростовой среде при тех же условиях.

Через 4 суток после заражения штаммами ВБН был проведен анализ жизнеспособности клеток колориметрическим методом с помощью коммерчески доступного набора CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA). В каждую лунку к 100 мкл культуральной среды добавляли 20 мкл реагента и инкубировали в течение 2 часов при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм. Жизнеспособность контрольных мононуклеарных клеток крови и карциномы Кребс-2 на 4 сутки после инфицирования штаммами ВБН оценивали по относительным значениям доли живых клеток к контрольным не обработанным вирусом клеткам.

Светооптические и иммуногистохимические исследования. Получение первичных поликлональных антител. Для получения первичных поликлональных антител была проведена подкожная иммунизация кроликов штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 в полном адьюванте Фрейнда. Через 23 дня повторяли инъекции вируса. Тотальный забор крови проводили через 46 дней, отделяли сыворотку и добавляли рецептор-разрушающий фермент (RDE). В дальнейшем сотрудниками лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН был получен препарат, представляющий собой IgG фракцию кроличьих антисывороток, очищенных аффинной хроматографией на иммуносорбенте белок А-сефароза 4В, в 0,02М К-фосфатном буфере, pH 7,3, 0,15М NaCl, 0,02% азида натрия. Исходная концентрация IgG 6,6 мг/мл.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток опухолевых линий человека. Для подтверждения наличия вируса и его визуализации в опухолевых клетках было проведено иммуноокрашивание клеток опухолевых линий HCT116 и MCF7, зараженных разведением 8ГАЕ/10 000 клеток штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011.

Опухолевые клетки инкубировали с вирусом 8 ГАЕ/10,000 клеток в течение 1 часа при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. После инкубации опухолевые клетки центрифугировали, убрали супернатант с вирусом, ресуспендировали в свежей ростовой среде и высевали на стекла в 6-луночный планшет в концентрации 150,000 клеток на лунку. Контрольные опухолевые клетки инкубировали в ростовой среде без вируса. Через двое суток

после заражения клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в фосфатно-солевом буфере при комнатной температуре 30 минут. Для отмывания клеток использовали раствор 0,25% TritonX100-ФСБ. Неспецифическую сорбцию клеток блокировали в растворе 0,25% TritonX100-ФСБ с 5% сыворотки козла (30 минут). Инкубировали фиксированные клетки с антителами к HN гликопротеину оболочки ВВН, разведенными в растворе 0,25% TritonX100-ФСБ с 5% сывороткой козла в соотношении 1:5000 (90 минут). Инкубировали клеток с коммерчески доступными вторичными антителами Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), разведенными в соотношении 1:2000 в растворе 0,25% TritonX100-ФСБ с 5% сывороткой козла (40 минут). Для окраски ядер клеток добавляли DAPI 0,1мкг/мл в ФСБ (20 минут). Препараты оставляли на сутки при температуре -4°C. Изображения были получены на флуоресцентном микроскопе в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Исследование противоопухолевой активности вируса *in vivo*. Для эксперимента на животной модели был взят вирус болезни Ньюкасла штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011, выделенный от сизого голубя в 2011 году. Вирус наработали в аллантаоисной жидкости РКЭ, центрифугировали на низких оборотах для удаления крупного дебриса и провели через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Работа по проведению вивального эксперимента состояла из двух этапов.

На первом этапе был проведен пилотный эксперимент на 4-х восьминедельных самцах мышей линии BALB/C. Всем мышам была привита внутримышечно в бедро асцитная карцинома Кребс-2 в концентрации 500,000 клеток в 100 мкл ФСБ. На третьи сутки после прививки двум экспериментальным мышам начали вводить интратуморально в бедро по 100 мкл штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 максимальной концентрации (256 ГАЕ/100мкл), а двум контрольным вводили физиологический раствор. Однократные инъекции продолжали делать ежедневно в течение 5 дней. На 28 день эксперимента после прививки опухоли оценивали распространенность внутримышечного опухолевого процесса с помощью метода магнитно-резонансной томографии (МРТ) на базе ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» SPF-вивария ИЦиГ СО РАН. После проведения МРТ животных выводили из эксперимента с забором биоматериала опухолевого солидного узла с прилежащими мышечными тканями для морфологического исследования методами световой микроскопии.

Для изучения динамики изменений структуры опухолевой ткани Кребс-2 под действием штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 был проведен второй этап эксперимента *in vivo*. Для проведения эксперимента было сформировано 3 группы по 20 животных: первая группа – контрольная группа с экспериментальным онкогенезом, не получавшая инъекции, вторая группа – экспериментальные мыши, которые получали интратуморальный курс виротерапии опухоли, третья группа – контрольная группа, получавшая инъекции аллантаоисной жидкости неинфицированных РКЭ, прошедшей центрифугирование и через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Доза вирусных инъекций, схема виротерапии и введения аллантаоисной жидкости, объем инъекций и условия содержания животных полностью аналогичны условиям первого эксперимента. Животных ежедневно взвешивали. Динамику роста опухоли оценивали, проводя ежедневные замеры конечности с помощью штангенциркуля. Полученные три замера в перпендикулярных плоскостях перемножали и получали объем опухоли (мм³). На 5, 10, 15 и 20 сутки после завершения курса инъекций (13, 18, 23, 28 сутки роста опухоли) по 5 животных из каждой группы выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков, далее проводили забор биоматериала аналогично первому эксперименту.

Светооптические и иммуногистохимические исследования. Для светооптического исследования материал опухолевой ткани Кребс-2 в мышечной ткани бедра фиксировали в 10% растворе формалина при температуре +4°C в течение трех суток. Далее, согласно стандартной проводке, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации, бутаноле и ксилоле. Затем заключали в парафиновую смесь «HISTAMIX» (Россия). С полученных парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4,5-5 мкм на ротационном микротоме Microm HM355 S (Thermo Fisher Scientific, Германия). Депарафинированные срезы окрашивали по стандартной

методике гематоксилин-эозином для получения обзорной окраски и заключали в канадский бальзам. Полученные окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа AxioImagerA1 с фотокамерой AxioCamMRc и программным обеспечением AxioVision (rel. 4.12) (ZEISS, Германия).

Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования проводили депарафинизацию, регидратацию, демаскировку выявляемых антигенов тканей в цитратном буфере (pH 9,0) в микроволновой печи с мощностью 700W, блокирование эндогенной пероксидазы, инкубирование с блокирующей сывороткой для протеинового блока. Полученные срезы опухоли Кребс-2 инкубировали со специфическими моноклональными антителами к CD34 и VEGFR. Антитела разводили согласно рекомендациям фирмы-производителя. Время инкубации составило 30 минут при комнатной температуре с последующим инкубированием со стрептавидиновым пероксидазным комплексом, ДАБ-субстратом и дополнительным докрасиванием препаратов гематоксилином. Для визуализации была использована система детекции NovoLink (Novocastra).

Морфометрический анализ. Морфометрический анализ структурных элементов тканей на световом уровне проводили с использованием закрытой тестовой системы из 100 точек и подсчитывали 50-100 полей зрения (Автандилов, 1990). Параметры считали при увеличении микроскопа 20, 40, 63 раз. При морфометрическом исследовании оценивали степень структурных изменений опухолевой ткани, учитывая объемную плотность некрозов (Vv), численную плотность сосудов микроциркуляторного русла (Nai).

Статистический анализ результатов оценки жизнеспособности опухолевых клеток проведена с помощью t-критерия Стьюдента. На основании t-критерия по таблице Стьюдента была определена вероятность различия сравниваемых средних величин. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Статистическую обработку полученных при морфометрической исследовании данных проводили с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор системы наработки и подготовка препаративного количества штаммов вируса болезни Ньюкасла. В работе использовали коллекцию штаммов ВБН в количестве 44 изолятов, представляющих собой урожай первого пассажа в аллантоисной жидкости на развивающихся куриных эмбрионах. Для получения рабочего объема вирусного материала каждого из 44 природных изолятов ВБН использовали две системы наработки вируса: первая система наработки вируса заключалась в однократном пассировании штаммов ВБН на культуре клеток Vero; вторая система наработки осуществлялась в аллантоисной полости РКЭ. Наличие вируса в аллантоисной и культуральной ВСЖ определяли в реакции гемагглютинации с эритроцитами петуха. Все выделенные штаммы агглютинировали эритроциты петуха в разных титрах: 640-5120 ГАЕ/мл для вирусного пула изолятов, наработанных в системе РКЭ, и < 40-640 ГАЕ/мл для вирусного пула изолятов, наработанных на клеточной культуре Vero.

Таблица 1. Титры изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных на территории Российской Федерации в период с 2008 по 2014 гг., по реакции гемагглютинации (РГА) и в тканевой цитопатической дозе на культуре Vero.

№	Изолят ВБН	Титр РГА* в системе РКЭ	Титр РГА* в системе Vero	Значение lgTCID ₅₀ /мл ±2σ (#)
1	NDV/Altai/garganey/49/2008	32	8	
2	NDV/Altai/gadwall/66/2008	16	8	
3	NDV/Amur/grasswarbler/267/2008	16	4	
4	NDV/Novosibirsk/mallard/718/2008	256	32	
5	NDV/Novosibirsk/shoveler/738/2010	16	4	
6	NDV/Novosibirsk/garganey/753/2008	128	32	4,4±0,29
7	NDV/Novosibirsk/garganey/767/2008	16	4	

8	NDV/Novosibirsk/garganey/769/2008	256	16	
9	NDV/Adygea/duck/12/2008	256	16	3,0±0,26
10	NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2008	256	32	
11	NDV/Altai/garganey/564/2009	16	8	
12	NDV/mallard/Amur/264/2009	256	32	
13	NDV/Kamchatka/gull/12/2009	128	8	
14	NDV/Kamchatka/gull/528/2009	16	2	
15	NDV/Novosibirsk/garganey/428/2010	16	8	
16	NDV/Novosibirsk/shoveler/429/2010	64	4	
17	NDV/Novosibirsk/garganey/452/2009	16	2	
18	NDV/Novosibirsk/garganey/465/2009	32	4	
19	NDV/Novosibirsk/goosander/529/2009	16	2	
20	NDV/Novosibirsk/garganey/746/2009	32	2	
21	NDV/Novosibirsk/mallard/4112/2009	16	< 2	
22	NDV/Yakutiya/mallard/860/2009	256	16	4,1±0,32
23	NDV/Altai/pigeon/777/2010	128	16	6,0±0,35
24	NDV/Altai/mallard/784/2010	16	16	
25	NDV/Amur/garganey/922/2010	64	4	
26	NDV/Amur/dove/992/2010	16	< 2	
27	NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010	256	16	3,9±0,28
28	NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010	128	8	3,5±0,34
29	NDV/Novosibirsk/garganey/322/2010	8	< 2	
30	NDV/Novosibirsk/garganey/329/2010	128	8	3,5±0,36
31	NDV/Novosibirsk/garganey/339/2010	128	8	
32	NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010	32	2	
33	NDV/Novosibirsk/garganey/389/2010	128	8	
34	NDV/Novosibirsk/shoveler/396/2010	16	4	
35	NDV/Novosibirsk/gadwall/703/2010	8	< 2	
36	NDV/Novosibirsk/shoveler/945/2010	32	2	
37	NDV/Sakhalin/pintail/47/2010	8	< 2	
38	NDV/Sakhalin/widgeon/48/2010	32	2	
39	NDV/Sakhalin/garganey/52/2010	32	8	
40	NDV/Sakhalin/pintail/53/2010	256	8	3,4±0,31
41	NDV/Altai/pigeon/770/2011	128	16	7,2±0,49
42	NDV/Yakutiya/mallard/852/2011	128	16	5,9±0,33
43	NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014	128	8	5,3±0,42
44	NDV/Tyva/gull/14/2014	128	8	4,5±0,44

* - значения титра РГА выражены в гемагглютинирующих единицах в 50 мкл ВСЖ (ГАЕ/50 мкл), # - значения титра TCID50 выражены в lgTCID50/мл±2σ.

Титры вирусного пула изолятов ВБН по результатам реакции РГА оказались значительно ниже при условии наработки на клеточной культуре Vero по сравнению с титрами аллантоисной ВСЖ. Значение гемагглютинирующего титра для одних и тех же изолятов ВБН различается максимум в 16 раз. Следовательно, использование системы наработки вируса на РКЭ выглядит намного привлекательнее ввиду получения высокой вирус-продукции при таком методе пассирования ВБН. Таким образом, наработка вируса болезни Ньюкасла для использования в качестве онколитического агента возможна в системе РКЭ по примеру других вакцин, а следовательно полученные результаты исследований настоящей работы являются адекватными и позволяют делать обоснованные выводы об эффективности онколитических свойств исследуемых штаммов ВБН.

Оценка инфекционного титра штаммов вируса болезни Ньюкасла. Для всех природных штаммов определен инфекционный титр TCID₅₀ на культуре клеток Vero. Для 12-ти изолятов был определен инфекционный титр в культуре клеток Vero по наличию морфологических изменений клеточного монослоя. Изоляты имели разные инфекционные титры для чувствительной культуры клеток. Различие между максимальным и минимальным значением инфекционного титра для разных штаммов составило более 4 lgTCID₅₀/мл. Как видно из таблицы 2, проанализированные штаммы агглютинируют эритроциты петуха в близких титрах, причем максимальные различия титров в РГА отличаются не более чем в 2 раза.

Первые изменения монослоя чувствительной клеточной культуры Vero при заражении штаммами вируса болезни Ньюкасла, проявлявших цитопатический эффект, наблюдаются на 2 сутки инфицирования в низких разведениях 10⁽⁻¹⁾-10⁽⁻³⁾. При исследовании инфицированных клеток Vero в светооптическом микроскопе можно отметить начало формирования очагов ЦПД в клеточном монослое (Рисунок 1).

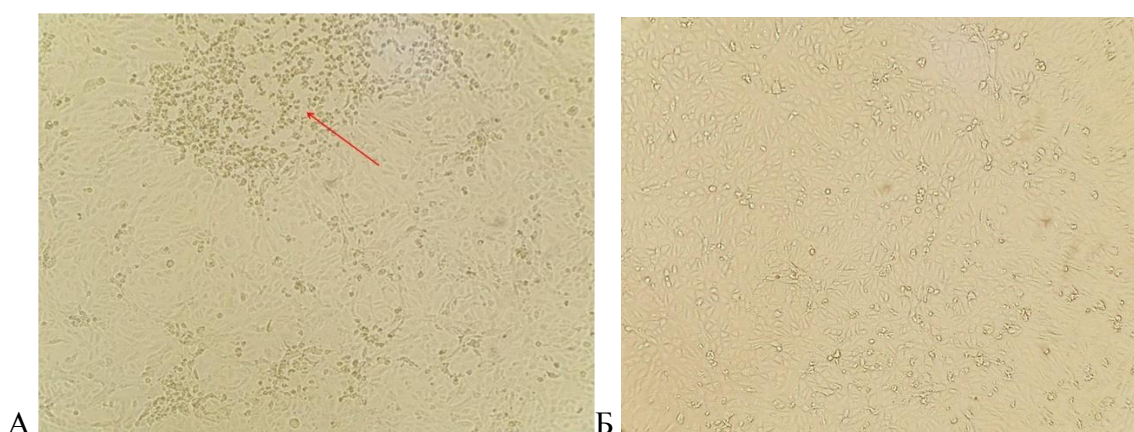


Рисунок 1. Светооптическое исследование морфологических изменений в клеточной культуре Vero, инфицированной вирусом болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011. Начало формирования очагов ЦПД. А. Разведение вируса 10⁽⁻²⁾. 36 часов после заражения вирусом. Увеличение 10х. Б. Контрольные не инфицированные вирусом клетки.

Цитопатический эффект достигает полной реализации в течение последующих 1-2-х суток после первых признаков морфологических изменений клеточного монослоя. При этом с развитием ЦПД появляется зернистость в цитоплазме уже на вторые сутки, фрагментация и округление клеток и дальнейшее их открепление от поверхности культурального флакона, в результате чего наблюдается нарушение монослоя (Рисунок 2Б, 3) по сравнению с контрольными клетками (Рисунок 2А). При этом клетки разрушаются и вирус высвобождается в среду.

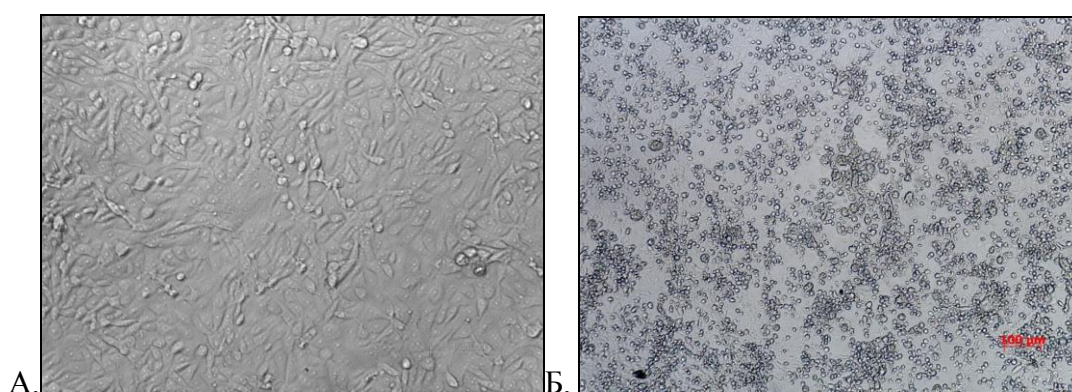


Рисунок 2. Светооптическое исследование морфологических изменений в контрольной клеточной культуре Vero, не инфицированной вирусом болезни Ньюкасла, увеличение 20х (А),

и инфицированной штаммом вирусом болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011, разведение вируса 10^{-4} . Увеличение 10х. (Б) 3-е сутки эксперимента.

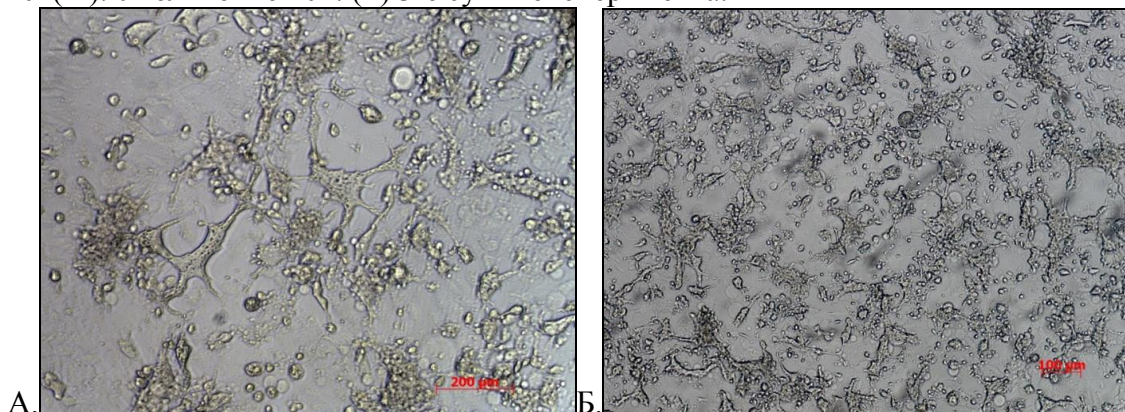


Рисунок 3. Светооптическое исследование морфологических изменений в клеточной культуре Vero, инфицированной штаммом вирусом болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011. Слияние погибших клеток. 3-е сутки эксперимента, разведение вируса 10^{-3} . Увеличение 20х (А). Увеличение 10х (Б).

Кроме того, из литературных данных известно, что для ВБН, как представителя семейства парамиксовирусов, характерна способность к образованию многоядерных клеточных структур, так называемого синцития, за счет взаимодействия F-белка и HN-белка на клеточных поверхностях зараженных клеток. При этом образование синцития делает возможным ускорить распространение вируса из инфицированных клеток в соседние неинфицированные клетки без высвобождения вирусного потомства. Клетки в составе синцития при отсутствии возможности к дальнейшему делению массово погибают. Данная стратегия считается удачной в реализации онколитического потенциала ВБН за счет ускорения внутриопухолевого распространения вируса. Тем не менее, в настоящей работе ни один из исследованных природных штаммов ВБН не демонстрирует способность провоцировать образование многоядерных клеток в первом пассаже на чувствительной клеточной культуре Vero. Однако при инфицировании клеток исследуемым штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 отмечено формирование синцитие-подобных структур, которые, вероятно, представляют собой результат слияния остатка клеточного детрита при быстром течении деструктивных процессов под действием вируса (Рисунок 3).

Инфекционный титр IgTCID₅₀/мл на светооптическом уровне не удалось определить у 32-х штаммов из коллекции. На третьи сутки эксперимента клеточный монослой Vero, зараженный этими штаммами, не отличается по морфологии от контрольных клеток. Однако известно, что в культуре клеток вирус может вызывать инфекции без разрушения клеточного монослоя. При этом может происходить персистенция вируса к клетке без выраженных морфологических изменений.

Различие в проявлении ЦПД на культуре Vero может быть объяснено различиями реализации и протекания цитопатического эффекта в зависимости от штамма вируса, дозы вируса, а также чувствительности клеток к инфекционному агенту. Однако помимо этого в настоящем исследовании показано, что выраженное ЦПД демонстрируют штаммы с высоким титром РГА. Штаммы с высокими гемагглютинирующими титрами (128-256 ГАЕ/50 мкл) имели схожие инфекционные титры по наличию ЦПД на чувствительной культуре клеток Vero. Следовательно, при инфицировании штаммами, способными к активной вирусной репликации с высоким титром РГА, нарушаются метаболические процессы, что приводит к подавлению синтеза нуклеиновых кислот и белков в клетке. При этом происходят изменения внутриклеточных метаболических процессов и, как следствие, гибель клеток.

Однако также известно, что инфицирование вирусами может и вовсе не вызывать разрушение монослоя и гибель клеток, в таком случае под световым микроскопом не удается определить выраженные морфологические изменения. В связи с этим для дальнейших исследований были выбраны штаммы демонстрирующие наличие ЦПД с установленным

инфекционным титром, а также штаммы, не приводящие к морфологическим изменениям клеток Vero, с целью оценки противоопухолевого потенциала данных штаммов.

Для удобства оценки и сравнения штаммов между собой из коллекции были выбраны штаммы для дальнейшей работы на основе полученных титров РГА. Подходящими считали титр от 32 ГАЕ на 50 мкл из расчета удобства инфицирования опухолевых клеток при оценке наличия онколитических свойств у природных изолятов ВБН. Из 44-х изолятов в коллекции получили 28 изолятов, которые использовали в данной работе.

Онколитическая активность природных изолятов вируса болезни Ньюкасла на опухолевых клеточных линиях человека *in vitro*. Для оценки цитотоксических свойств штаммов вируса болезни Ньюкасла исследовали жизнеспособность опухолевых клеточных линий после инкубации со штаммами ВБН, используя общепринятый скрининговый метод МТТ-тест.

Объектами исследования цитотоксичности природных штаммов ВБН служили опухолевые клеточные линии человека НСТ116+/, HeLa, A549 и MCF7. МТТ-тест ставили на четвертые сутки после инфицирования клеточного монослоя штаммами вируса. Клетки высаживали на планшет и через сутки монослой заражали разными разведениями вируса — 2, 8 и 16 ГАЕ на 10,000 клеток. На четвертые сутки после инфицирования проводили оценку жизнеспособности клеток колориметрическим методом МТТ-анализа (при длине волны 540 нм). МТТ-тест дает представление о метаболической активности исследуемых клеток, что позволяет дать оценку о специфической гибели клеток после инфицирования вирусом. Результаты МТТ-теста представлены на рисунке 4.

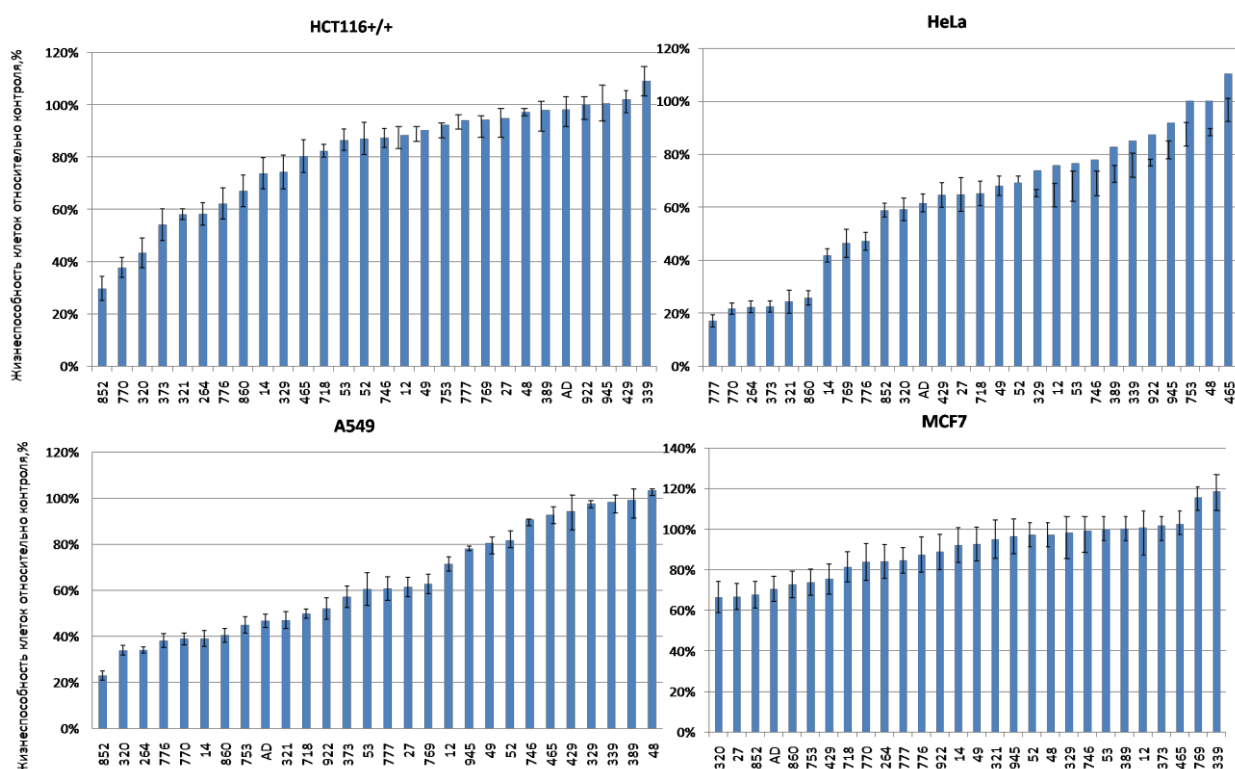


Рисунок 4. Результаты МТТ-теста. Жизнеспособность опухолевых клеточных культур НСТ116+/, HeLa, A549 и MCF7 после экспозиции со штаммами ВБН, 4-е сутки инкубации. Результаты контроля опухолевых клеток, инкубированных со средой, приняты за 100%. Результаты представлены в процентах как средние относительные значения доли живых клеток на 4-е сутки после обработки штаммами вируса к доли контрольных, не обработанных вирусом клеток с учетом стандартного отклонения (среднее относительное значение \pm стандартное отклонение).

Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток карциномы толстой кишки НСТ116. Как следует из данных рисунка 4, исследуемые штаммы оказывают цитотоксическое действие на клетки линии НСТ116, при этом процент гибели

тестируемых клеток значительно варьируется при инфицировании разными штаммами. Несмотря на иллюстрацию цитотоксического эффекта штаммов ВБН, клетки линии колоректального рака сохраняли высокую жизнеспособность (более 80%) после инфицирования 60% исследуемыми штаммами, а в 25% случаев штаммы не влияли на пролиферативную активность клеток и результаты МТТ-теста не отличались от результатов в контрольных неинфицированных клетках.

На опухолевой клеточной линии колоректального рака НСТ116 наиболее выраженный онколитический эффект со снижением жизнеспособных клеток более чем в два с половиной раза по сравнению с контролем продемонстрировали штаммы NDV/Yakutiya/mallard/852/2011 – 29,80%±4,60% жизнеспособных клеток, NDV/Altai/pigeon/770/2011 – 37,80%±3,85% жизнеспособных опухолевых клеток и NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010 - 43,46%±5,65% клеток на четвертые сутки после инфицирования дозой вируса 16 ГАЕ/10,000 клеток. Онколитические эффекты остальных штаммов относительно клеток НСТ116 оказались менее выраженными, так как жизнеспособность данной клеточной линии составила порядка 50-60%: NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010 – 54,18%±6,12%, NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010 – 58,20%±2,14%, NDV/mallard/Amur/264/2009 – 58,34%±4,36% и NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2010 – 62,24%±5,96% жизнеспособных опухолевых клеток на четвертые сутки после инфицирования дозой вируса 16 ГАЕ/10,000 клеток.

Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток эпидермоидной карциномы рака шейки матки HeLa. Клетки опухолевой линии карциномы шейки матки HeLa оказались чувствительны к онколитическому действию 11 штаммов ВБН – 7 выше упомянутых и еще 4 штамма – NDV/Novosibirsk/garganey/769/2008, NDV/Yakutiya/mallard/860/2009, NDV/Altai/pigeon/777/2010, NDV/Tyva/gull/14/2014 (Рисунок 4).

Наиболее выраженный онколитический потенциал на данной линии клеток (менее 30% жизнеспособных клеток на четвертые сутки после инфицирования дозой вируса 16 ГАЕ/10,000 клеток) наблюдается для NDV/Altai/pigeon/777/2010 – 17,17%±2,36%, NDV/Altai/pigeon/770/2011 - 21,71%±2,10%, NDV/mallard/Amur/264/2009 – 22,45%±2,19%, NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010 – 22,58%±2,12%, NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010 – 24,42%±4,32%, NDV/Yakutiya/mallard/860/2009 - 25,79%±2,70%.

Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток немелкоклеточной карциномы легкого А549. Хороший противоопухолевый эффект (до 60% жизнеспособных опухолевых клеток на четвертые сутки после инфицирования вирусом в дозе 16 ГАЕ/10,000 клеток) на опухолевой клеточной линии немелкоклеточного рака легкого человека А549 показали 17 изолятов ВБН – 11 выше упомянутых и еще 6 штаммов – NDV/Novosibirsk/mallard/718/2008, NDV/Sakhalin/pintail/53/2010, NDV/Amur/garganey/922/2010, NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014, NDV/Adygea/duck/12/2008, NDV/Novosibirsk/garganey/753/2008 (Рисунок 4). Наиболее выраженный противоопухолевый эффект (до 40% жизнеспособных клеток после инфицирования) на клетках А549 показали штаммы NDV/Yakutiya/mallard/852/2011 – 22,96%±1,95%, NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010 – 33,94%±2,17%, NDV/mallard/Amur/264/2009 – 34,15%±1,34%, NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2010 - 38,10%±3,01%, NDV/Altai/pigeon/770/2011 - 38,89%±2,54% и NDV/Tyva/gull/14/2014 – 39,02%±3,43%.

Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток аденокарциномы молочной железы MCF7. Наибольшую резистентность к онколитическому действию всех штаммов вируса болезни Ньюкасла демонстрирует перевиваемая опухолевая клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF7. Результаты МТТ-теста в отношении культуры MCF7 показывают, что онколитический потенциал всех штаммов невысок для клеток MCF7, так как жизнеспособность опухолевых клеток этой линии варьируется от 80 до 100%, что можно видеть по гистограмме.

Однако среди всех штаммов ВБН наибольшее противоопухолевое действие на клетках MCF7 показывают штаммы NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010 – 66,58%±7,65%, NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014 – 66,82%±6,53%, NDV/Yakutiya/mallard/852/2011 –

67,70%±8,73%, NDV/Adygea/duck/12/2008 – 70,60%±6,47%, NDV/Yakutiya/mallard/860/2009 – 72,74%±6,54%, NDV/Novosibirsk/garganey/753/2008 – 73,89%±6,26%, NDV/Novosibirsk/shoveler/429/2010 – 75,51%±6,45%, NDV/Novosibirsk/mallard/718/2008 – 81,35%±7,45%, 770 NDV/Altai/pigeon/770/2011 – 83,80%±8,96%.

Исходя из полученных данных по жизнеспособности опухолевых клеток различной этиологии и гистогенеза под действием инфицирования природными изолятами вируса болезни Ньюкасла, получили результаты о различной чувствительности опухолевых линий к действию изолятов ВБН. Наиболее чувствительной оказались линии немелкоклеточной карциномы легкого A549 – противоопухолевый эффект на клетках данной линии проявляли 17 штаммов, и карциномы шейки матки HeLa – 11 штаммов показали выраженные онколитические свойства. Наименее чувствительной оказалась линия аденокарциномы молочной железы MCF7, жизнеспособность клеток которой после инкубации с вирусами оставалась на высоком уровне.

Из 28 природных изолятов ВБН, проверенных на наличие онколитического потенциала в настоящей работе, наиболее выраженный онколитический потенциал относительно всех опухолевых клеточных линий человека показали 7 штаммов – NDV/mallard/Amur/264/2009, NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010, NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010, NDV/Altai/pigeon/770/2011, NDV/Yakutiya/mallard/852/2011 и NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2010 (Рисунок 5).

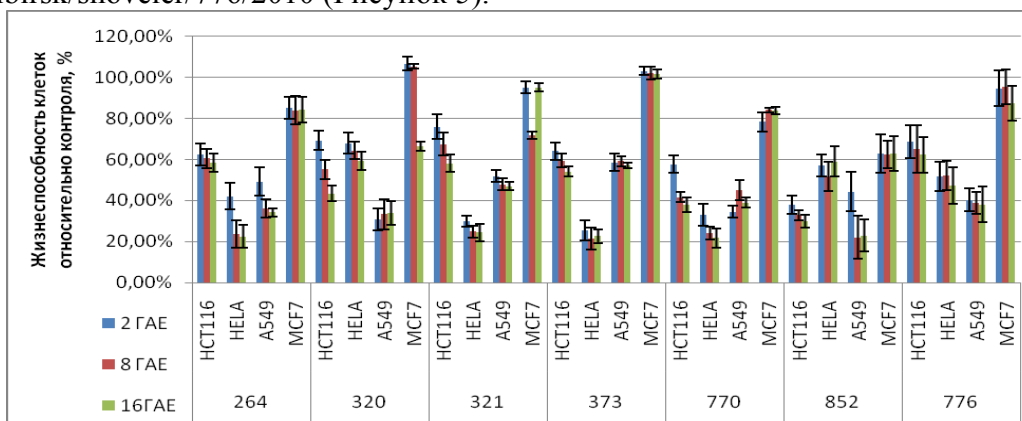


Рисунок 5. Природные изоляты вируса болезни Ньюкасла с наиболее выраженными онколитическими свойствами на всех исследуемых опухолевых клеточных линиях человека, МТТ-анализ.

По полученным данным прослеживается дозозависимое проявление онколитических свойств природных штаммов ВБН. Жизнеспособность клеток опухолевых линий снижается в среднем на 5-10% при увеличении дозы вируса с 2 до 16 ГАЕ/10,000 клеток. Также из полученных результатов видно, что проявление онколитического эффекта вируса не зависит от этиологии опухолевых клеток, будь то карцинома толстой кишки, шейки матки или немелкоклеточная карцинома легкого, что уже было показано в ранее опубликованных работах.

Однако стоит отметить, что вероятно имеет место избирательность в проявлении эффективности онколитических свойств отдельных штаммов ВБН в отношении конкретных линий опухолевых клеток. Штаммы, представленные на рисунке 5, проявляют свои онколитические свойства на разных исследованных опухолевых линиях, однако процент жизнеспособности клеток на разных линиях значительно варьирует для одних и тех же штаммов – так, например, штамм NDV/Yakutiya/mallard/852/2011 высоко эффективен против клеточной линии A549, однако значительно уступает в противоопухолевом потенциале против линии клеток HeLa. Аналогичные результаты в отношении клеток A549 и HeLa получены для штамма NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, но при этом на опухолевых клетках HCT116 эффективность штаммов NDV/Yakutiya/mallard/852/2011 и NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010 различается – 29,8% и 43,46%, соответственно.

Оценка цитотоксичности штаммов ВБН на нормальных нетрансформированных клетках человека методом МТТ. В качестве контрольных клеток для оценки жизнеспособности нормальных клеток человека при культивировании их в среде с вирусом

использовали мононуклеарные клетки периферической крови условно здорового донора с целью подтверждения проявления избирательного токсического действия исключительно на трансформированные клетки. Сразу после часа экспозиции со штаммами вируса и в течение последующих 4-х дней культивирования в клеточной культуре МНПК не наблюдалось видимых морфологических нарушений структуры клеток по сравнению с контрольными клетками, не инфицированными вирусом болезни Ньюкасла.

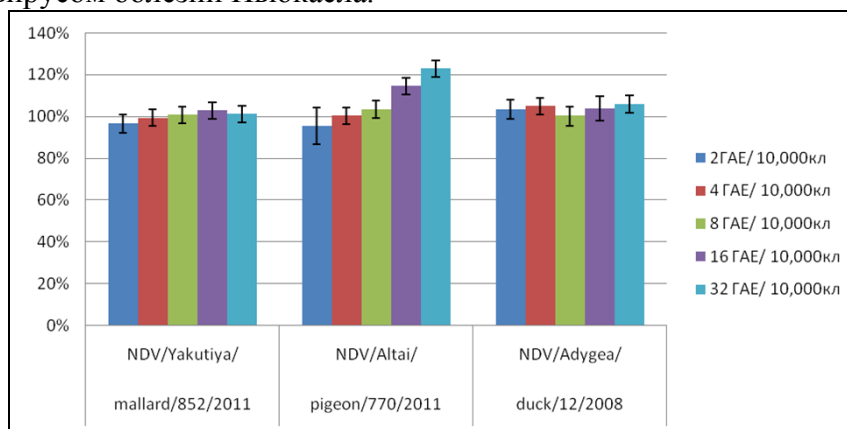


Рисунок 6. Жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови условно здорового донора после экспозиции со штаммами ВБН на 4-е сутки инкубации. Результаты контроля – клеток МНПК, после экспозиции со средой, приняты за 100%, результаты МТТ-теста.

После экспозиции клеток со штаммами вируса жизнеспособность МНПК варьировала в исследуемой группе по сравнению с контрольной в пределах от 94% до 110%. Данные результаты показывают, что выбранные для МТТ-теста штаммы не оказывают токсического действия на МНПК, так как жизнеспособность клеток после инфицирования штаммами вируса не снижается.

Штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011, выделенный от сизого голубя и относящийся к отдельной группе вирусов болезни Ньюкасла - голубиным парамиксовирусам сератипа-1 (PPMV-1), был выбран из штаммов с наиболее выраженным онколитическим потенциалом в отношении опухолевых клеточных линий *in vitro* для последующих исследований.

Получение кроличьих первичных антител к штамму NDV/Altai/pigeon/770/2011. Через 23 дня после иммунизации кроликов был проведен забор крови (по 5 мл) из ушной вены для проверки титра антител против штамма ВБН в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Реакция РТГА показала средний уровень титра антител. Кроликам было повторно введен вирус. Тотальный забор крови (по 45 мл) проводили через 23 дня после повторной иммунизации. Очищенная сыворотка показала высокий титр антител против штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011. Препарат фракции IgG был выделен из 5 мл исходной кроличьей антисыворотки. Концентрация антител составила 6,6 мг/мл. Общее количество антител составило 39 мг.

Иммуноцитохимический анализ клеток опухолевых линий человека, инфицированных штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011. Наличие вируса в клетках опухолевых линий человека было подтверждено с помощью техники иммуноокрашивания флуоресцентными антителами. Иммуноцитохимическое окрашивание проводили на опухолевой линии клеток колоректального рака HCT116 (Рисунок 5), как чувствительной к онколитическому действию культуры, и на культуре клеток аденокарциномы молочной железы MCF7 (Рисунок 4), проявляющей резистентность к воздействию штаммов ВБН.

Помимо подтверждения наличия вируса в опухолевых клетках после инфицирования, нам представлялось важным оценить локализацию и распределение вирусных частиц в клеточной популяции.

Для заражения было подобрано среднее значение титра вируса равное 8 GAЕ/10,000 клеток. Иммуноокрашивание не зараженных вирусом контрольных клеток колоректального рака

НСТ116 и клеток аденокарциномы молочной железы MCF7 дало отрицательный результат. На полученных изображениях хорошо видны ядра клеток, окрашенные DAPI. Никаких других окрашенных флуоресцентных аккумуляций и агрегаций в цитоплазме и ядрах на препарате контрольных опухолевых клеток не обнаружено (Рисунок 7А, Б).

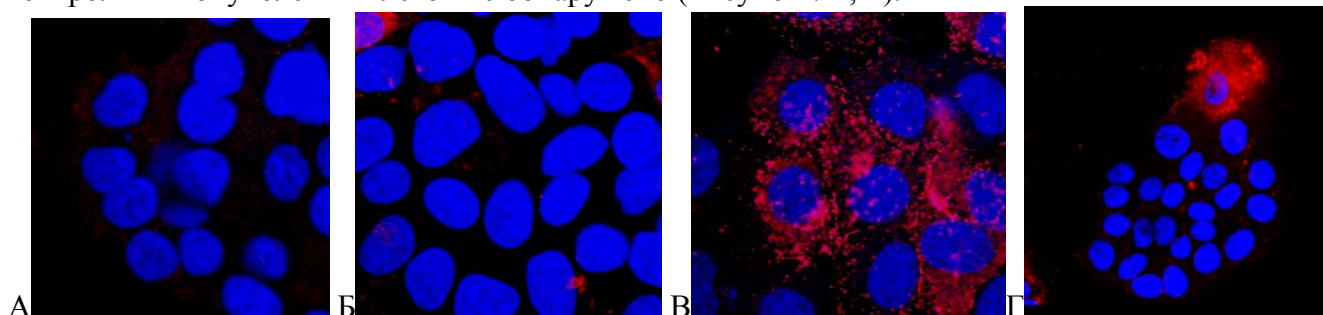


Рисунок 7. (А) Иммуноокрашивание контрольных не инфицированных вирусом клеток опухолевой линии колоректального рака человека НСТ116. (Б) Иммуноокрашивание контрольных не инфицированных вирусом клеток опухолевой линии аденокарциномы молочной железы человека MCF7. Иммуноокрашивание клеток опухолевой линии карциномы толстой кишки НСТ116 (В) и аденокарциномы молочной железы MCF7 (Г), зараженных штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 (разведение 8 ГАЕ/10,000 клеток). Вторые сутки после инфицирования вирусом. Флуоресцентная микроскопия, 100х увеличение. Ядра окрашены DAPI, вторичные антитела – Alexa Fluor® 546.

Препараты зараженных вирусом клеток обеих опухолевых линий человека демонстрируют положительный результат иммуноокрашивания.

В клетках колоректального рака НСТ116 и аденокарциномы молочной железы MCF7 помимо окрашенных ядер выявляется яркое флуоресцентное окрашивание нитчатых структур, располагающихся в цитоплазме клеток. Эти структуры соответствуют положению вирусных частиц штамма NDV/Altai/pigeon/770/2010 в опухолевых клетках.

Результаты флуоресцентной микроскопии окрашенных препаратов позволили предположить возможные типы заражения вирусными частицами разных опухолевых клеточных линий и выявить специфику при инфицировании и персистенции в конкретных опухолевых линиях.

В клетках колоректального рака НСТ116, проявляющих чувствительность к онколитическому действию штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011, окрашенные вирусные нитчатые структуры выявлены в цитоплазме всех клеток и расположены в основном равномерно по всей цитоплазме (Рисунок 7В).

Другая картина расположения вирусных частиц в культуре представлена в клетках аденокарциномы молочной железы MCF7. В этой линии опухолевых клеток вирус оказался сконцентрирован преимущественно в цитоплазме отдельных клеток, в то время как в других клетках окрашены только ядра и присутствие в цитоплазме вирусных частиц не выявляется (Рисунок 7Г).

Можно предположить, что при заражении разных опухолевых культур вирус имеет различную специфику инфицирования клеток. Для опухолевой клеточной линии MCF7 характерно заражение вирусом отдельных клеток, не распространяющееся на соседние клетки. Такой способ инфицирования вирусом, возможно, обуславливает резистентность этой опухолевой линии к воздействию исследованного штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011, что было продемонстрировано в эксперименте с оценкой жизнеспособности клеток. С другой стороны, при заражении этой же концентрацией вируса опухолевой клеточной линии НСТ116 наблюдается активная репликация вируса во всех инфицированных клетках. Вероятно, этим объясняется высокая чувствительность данной линии клеток к воздействию вируса. И, как следствие, чем эффективнее происходит инфицирование вирусом опухолевых клеток, тем, соответственно, больше из их числа подвергаются онколизису и гибнут.

Оценка жизнеспособности клеток мышинной асцитной опухоли Кребс-2 в эксперименте *in vitro*. Исследованию виротерапевтического потенциала ВБН на модели

экспериментального онкогенеза *in vivo* предшествовал дополнительный эксперимент. Для подтверждения наличия онколитического потенциала вируса болезни Ньюкасла сначала была проведена оценка жизнеспособности опухолевых клеток мышинной опухолевой линии Кребс-2 в системе *in vitro* использованием выбранных нами штаммов.

На третьи сутки после инфицирования разными штаммами ВБН жизнеспособность клеток асцитной опухоли Кребс-2 варьирует от 60% до 100%. Способность лизировать клетки данной опухоли показали исследованные штаммы ВБН, за исключением одного штамма NDV/Adygea/duck/12/2008 (Рисунок 8).

Природный штамм NDV/Adygea/duck/12/2008, демонстрировавший наименее выраженный онколитический потенциал в отношении линий опухолевых клеток человека, не показал онколитический эффект на клетках опухоли Кребс-2, полученной от мышей.

Природные штаммы NDV/Yakutia/mallard/852/2011 и NDV/Altai/pigeon/770/2011 продемонстрировали наличие онколитического потенциала в отношении опухолевых клеток Кребс-2. Причем жизнеспособность клеток после инфицирования каждым варьируется от 60% до 75%.

Штаммы ВБН проявляют онколитический потенциал в отношении клеток мышинной опухоли Кребс-2, хотя он заметно ниже, чем был продемонстрирован в подобном эксперименте на линиях опухолевых клеток человека.

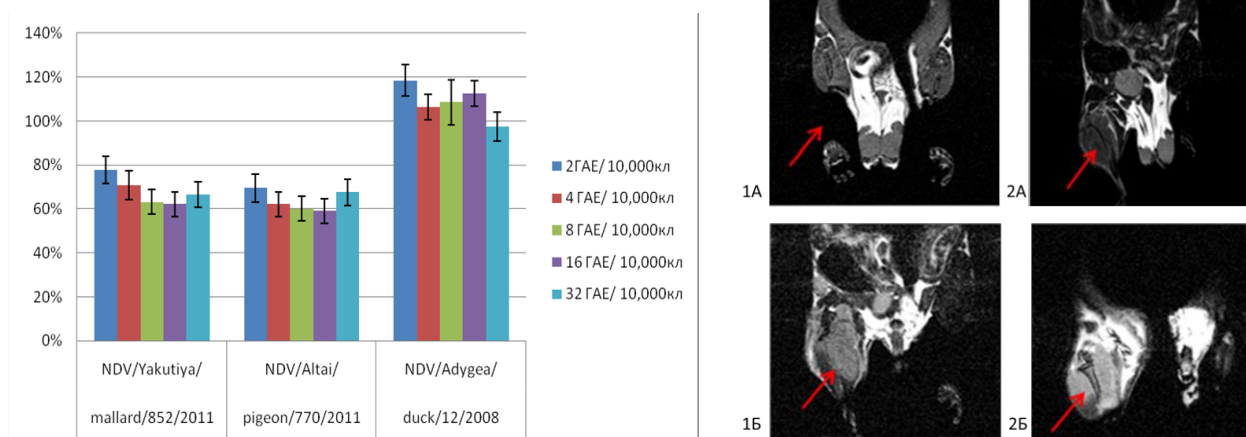


Рисунок 8. Онколитический эффект природных штаммов ВБН – NDV/Yakutia/mallard/852/2011, NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Adygea/duck/12/2008 на клетках мышинной асцитной карциномы Krebs-2 на четвертые сутки после инфицирования.

Рисунок 9. Магнитно-резонансная томография. Серии фронтальных срезов на 28 сутки с начала эксперимента *in vivo* на мышах линии BALB/С. Стрелками указано расположение опухоли. А. Экспериментальные мыши, получавшие интратуморально инъекции вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 максимальной концентрации в течение 5 дней: 1А – полная регрессия опухоли по сравнению с контрольными животными, 2А - значительная редукция опухоли по сравнению с контрольными животными; Б. Контрольные мыши, получавшие инъекции физиологического раствора: 1Б, 2Б.

По результатам исследования такие штаммы, как NDV/Yakutia/mallard/852/2011 и NDV/Altai/pigeon/770/2011 проявляют одинаковую онколитическую активность на клетках мышинной опухоли. Для дальнейших работ нами был выбран штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011 для эксперимента на вивальной модели.

Исследование противоопухолевой активности природного штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на опухолевую прогрессию солидного узла мышинной карциномы Кребс-2. Пилотный эксперимент *in vivo* на мышах линии BALB/С. Предварительный эксперимент по виротерапии штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 проводили на 7-недельных мышах линии BALB/с. Животным прививали культуру опухолевых клеток Кребс-2. Клетки этой мышинной карциномы формируют опухолевый узел при внутримышечном введении, прогрессивная динамика роста которого позволяет провести курс виротерапии.

Пилотный эксперимент был проведен на небольшом количестве животных – по два животных в контрольной и экспериментальной группе. Цель данного исследования заключалась в оценке динамики внутримышечного развития процесса онкогенеза опухоли Кребс-2 с формированием опухолевого солидного узла на модели *in vivo*, наблюдении за состоянием животных в процессе развития опухоли и предварительной оценке противоопухолевого эффекта серии интратуморальных инъекций природного штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011.

По результатам начального эксперимента на третьи сутки после внутримышечной прививки опухолевых клеток Кребс-2 в бедре всех четырех мышей появилось уплотнение, которое прощупывалось при пальпировании и являлось характерным признаком для начала формирования опухоли. С началом формирования опухоли (на 4-е сутки после прививки опухоли) начали вводить интратуморально инъекции штамма вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 экспериментальным мышам. С этой целью в каждую опухоль экспериментальных животных вводили по 100 мкл вирус-содержащей жидкости в концентрации 128 ГАЕ/100 мкл, обкалывая солидный узел для более равномерного и эффективного распределения вируса внутри опухоли. В течение последующих пяти дней эксперимента, в которые проводили внутримышечные инъекции вируса, трудно говорить об изменениях размеров опухоли, ее прогрессии или начале регрессии, так как на первых этапах введения вируса в районе опухоли развивается воспалительный процесс, характеризующийся отеком, что препятствует визуальной оценке возможных изменений.

Опухоли, привитые контрольным животным, обрабатывались инъекциями физиологического раствора по той же схеме и в том же объеме. Схожие процессы (развитие воспалительного процесса, отечность тканей) наблюдали и в группе контрольных животных, получавших интратуморальные инъекции физиологического раствора.

На более поздних этапах экспериментальные опухоли сравнивали с опухолями контрольных мышей. Так на 9-10-й день эксперимента после прививки опухолевых клеток визуально стало заметно, что бедро с опухолью контрольных мышей имеет более выраженную шарообразную форму, нежели у экспериментальных мышей, получавших курс виротерапии штаммом ВБН. На протяжении эксперимента мыши обеих групп активно потребляли корм и воду. Однако уже на 14-16-й день контрольные животные стали менее подвижны, вялые. На 28-й день с начала прививки опухолевых клеток все мыши были выведены эксперимента.

Для того, чтобы детально визуализировать прогрессию роста опухолевого узла в группе контрольных животных и сравнить полученные различия с размерами внутримышечной опухоли животных экспериментальной группы, по окончании эксперимента была проведена МРТ. На сериях фронтальных срезов, полученных при помощи МРТ, опухоль визуализируется очень четко на фоне здоровых тканей. По полученным результатам удалось установить практически полную регрессию опухоли в случае первой экспериментальной мыши и значительную редукцию опухоли второй мыши по сравнению с контрольными животными (Рисунок 9).

Оценка патоморфологических особенностей опухолевой ткани после курса виротерапии в пилотном эксперименте *in vivo* на мышцах линии BALB/C. Оценка иммунного статуса организма под воздействием виротерапии. Биоматериал опухолевой ткани, полученный от животных в пилотном эксперименте, показал наличие противоопухолевого потенциала штамма вируса болезни Ньюкасла в отношении опухолевой прогрессии карциномы Кребс-2.

Анализ препаратов опухолевой ткани двух экспериментальных животных, получавших интратуморальные инъекции вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011, подтвердил почти полное отсутствие опухолевой ткани, за исключением отдельных опухолевых островков, у одной мыши (Рисунок 10А), и некротические процессы в опухолевом узле карциномы Кребс-2 у второй мыши (Рисунок 10Б) со значительной регрессией опухоли по сравнению с контрольными не лечеными животными. Кроме наличия некротических процессов, в мышечной ткани, лежащей рядом с опухолевым узлом, обнаружены клетки иммунной системы – нейтрофилы, лимфоциты

и активированные макрофаги, что говорит о возможном опосредованном иммуностимулирующем механизме вирусного воздействия на опухоль помимо прямого онколизиса (Рисунок 10В).

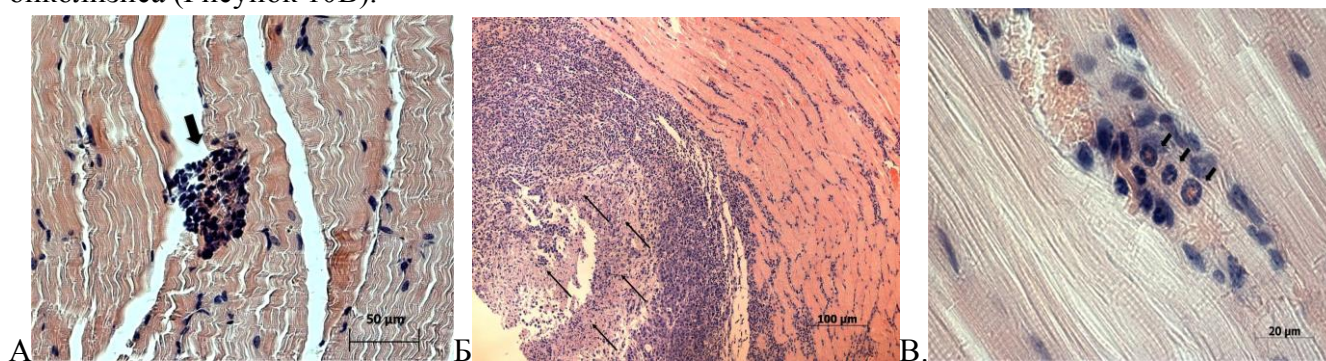


Рисунок 10. (А) Отдельные опухолевые островки (указан стрелкой) карциномы Кребс-2 среди мышечной ткани мыши, получавшей серию интратуморальных инъекций штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Alai/pigeon/770/2011 и демонстрирующей на МРТ-снимках почти полную регрессию опухоли. (Б) Некротические изменения (указаны стрелками) в опухолевой ткани солидного узла карциномы Кребс-2 у мыши, получавшей серию инъекций штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 и демонстрирующей на МРТ-снимках значительную редукцию опухоли. (В) Нейтрофилы, лимфоциты и активированные макрофаги (указаны стрелками) в мышечной ткани вокруг опухолевого узла карциномы Кребс-2 у мыши, получавшей серию инъекций штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 и демонстрирующей на МРТ-снимках значительную редукцию опухоли. 20-е сутки после виротерапии (28-е сутки роста опухоли), окраска гематоксилин-эозин.

Исследование противоопухолевой активности природного штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на опухолевую прогрессию солидного узла мышечной карциномы Кребс-2. Целью повторного этапа эксперимента на модели экспериментальной мышечной карциномы Кребс-2 было изучение и статистически значимая оценка динамики изменений опухолевого развития солидного узла на разных временных точках после проведения курса интратуморальной виротерапии и оценка морфологических изменений опухолевой ткани после инъекций вируса в сравнении с не лечеными вирусом опухолями животных.

В месте трансплантации опухолевых клеток визуально на 7-е сутки было заметно формирование солидного узла. В контрольных группах опухолевый процесс развивался и прогрессировал, в то время как в группе, получавшей виротерапию живым вирусом, наблюдалось снижение скорости роста опухоли.

На 20-е сутки (после окончания серии инъекций) средний размер опухоли в группе мышей, получавших инъекции живого вируса болезни Ньюкасла составил $1779,1 \pm 79,98$ мм³, в то время как в контрольных группах мышей, получавших инъекции физиологического раствора и инъекции чистого неинфицированного куриного аллантаоиса, составил $4659,9 \pm 704,75$ и $4899,1 \pm 807,69$ мм³, соответственно.

На 20-е сутки после виротерапии средний размер опухоли в группе мышей, получавших инъекции живого вируса болезни Ньюкасла был в 2,6 раз меньше, чем в контрольной группе. Из графика и фотографий видно, что в контрольной группе опухолевый процесс развивался и прогрессировал, в то время как в группе, получавшей виротерапию живым вирусом, наблюдалось снижение скорости роста опухоли.

Таким образом, полученные данные о сдерживании роста опухоли на фоне введения серии интратуморальных инъекций вируса болезни Ньюкасла потребовали уточнения морфологических изменений и возможных механизмов торможения опухолевого процесса.

Оценка патоморфологических особенностей опухолевой ткани после курса виротерапии. Оценка иммунного статуса организма под воздействием виротерапии. Макроскопический препарат опухоли солидного узла карциномы Кребс-2 представляет собой бело-розовый узел из слабо дифференцированных крупных округлых или овальных клеток. В ходе сравнительного анализа опухоли на разных временных точках наблюдалось увеличение

объема, появления кровоизлияний в ткани. В центральной части опухолевых узлов заметны наиболее обширные участки некрозов с небольшими опухолевыми островками. Очаги лейкоцитарной инфильтрации не наблюдаются.

Микроскопический препарат представлял собой опухолевую ткань, состоящую из атипичных округлых опухолевых клеток, часто встречались клетки в состоянии некроза. Мышечные волокна на микропрепаратах разрушены при инвазивном росте опухоли. Метастазов не наблюдалось. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином.

В сравнении опухолевой ткани контрольных животных и животных после курса виротерапии на 5-е и 20-е сутки видно, что в экспериментальной группе на разных временных точках наблюдаются очаги некротических изменений ткани. Интратуморальное введение инъекций штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 способствует более ранним и масштабным некротическим изменениям.

Сравнительный анализ опухолей, полученных от нелеченных животных и от животных после виротерапии, с использованием гистологических, иммуногистологических, морфометрических методов оценки. В опухолевой ткани контрольных животных, получавших инъекции физиологического раствора, и экспериментальных животных, получавших живой вирус наблюдалась динамика распространения полей некрозов. Результаты динамики изменения объемной плотности некрозов в опухолевой ткани представлены в виде гистограммы как средние относительные значения с учетом стандартной ошибки (среднее относительное значение \pm стандартное отклонение, $M \pm SE$) (Рисунок 11А).

В контрольной группе животных на 5-е сутки после курса инъекций физиологического раствора было зафиксировано $8,8 \pm 1,76\%$ объемной плотности некрозов. К 10-м и 15-м суткам доля некрозов составила соответственно $13,5 \pm 1,34\%$ и $15,3 \pm 2,51\%$, а к 20-м суткам увеличилась до $19,8 \pm 3,55\%$.

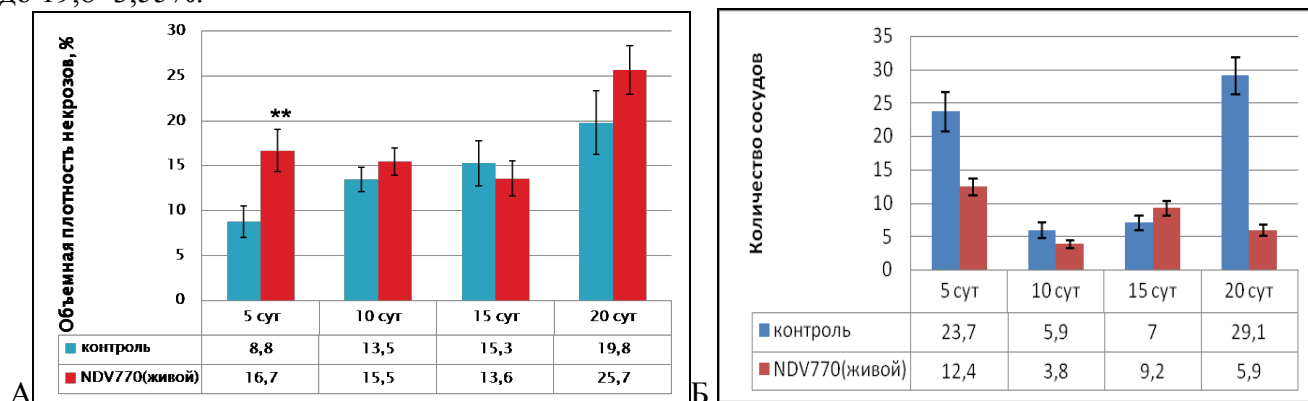


Рисунок 11. (А) Объемная плотность некрозов в опухолевой ткани Кребс-2 в группе животных, получавших инъекции физиологического раствора (контроль), и в группе, получавшей инъекции живого штамма вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 (NDV770 (живой)) (%). $**p < 0,01$ относительно контрольной группы. (Б) Среднее количество крупных сосудов в поле зрения (увеличение 20х). Контроль – группа животных, получавших инъекции физиологического раствора; NDV770 (живой) – группа животных, получавшая инъекции живого штамма вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011.

Появление обширных полей некрозов в контрольной группе может отражать формирование очагов ишемии в опухолевой ткани, появляющихся в результате быстрого развития опухолевого узла и замедленного неангиогенеза.

Введение живого вируса на 5-е сутки индуцировало некротические процессы, которые заняли $16,7 \pm 2,35\%$ объемной плотности ткани. Этот показатель незначительно менялся к 10-м и 15-м суткам и составил соответственно $15,5 \pm 1,51\%$ и $13,6 \pm 1,95\%$. На 10-е и 15-е сутки показатель объемной плотности некрозов соответствовал показателю в контрольной группе животных. Однако к 20-м суткам показатель возрос до $25,7 \pm 2,68\%$.

В результате отмечается нарастание объемной плотности некрозов в динамике роста опухолевого узла в обеих группах животных. Однако в контрольной группе этот рост наиболее плавный с максимумом $19,8 \pm 3,55\%$, тогда как в экспериментальной группе уже к 5-м суткам отмечается высокий уровень показателя плотности некрозов, который держится и на 15-е сутки и значительно возрастает к 20-м суткам до $25,7 \pm 2,68\%$.

Отмечается взаимосвязь увеличения объема опухолевого узла и роста объемной плотности некрозов в опухолевой ткани, что обусловлено быстрым ростом опухоли и нехваткой при этом питающих сосудов. Однако стоит отметить, что введение инъекций вируса способствует развитию некротических изменений на более ранних стадиях роста опухоли и росту значительной доли некрозов на более поздних сроках.

Численная плотность сосудов в опухолевой ткани после инъекций вируса примерно в 2 и более раз меньше, чем в контрольной группе. Морфометрический анализ крупных кровеносных сосудов (Рисунок 11Б) в опухоли контрольных животных показал, что количество крупных визуально различимых сосудов в опухолевой ткани резко снижается в 4 раза на 10-е сутки по сравнению с 5-ми сутками. Это значение сохраняется и на 15-е сутки. Вероятно, это связано с высокими темпами роста опухоли, при котором новые сосуды не успевают образовываться и, как следствие, нарушается трофика опухолевой ткани. К 20-м суткам число крупных сосудов в поле зрения повышается в среднем больше, чем в 4 раза, что отражает неоангиогенез в опухолевой ткани. В группе животных, получавших курс виротерапии живым вирусом, уже на 5-е сутки среднее число крупных сосудов в два раза меньше по сравнению с контрольной группой. К 10-м и 15-м суткам в экспериментальной группе отмечается аналогичное контрольной группе незначительное снижение количества сосудов, однако на 20-е сутки число сосудов остается незначительным в отличие от резкого увеличения, которое наблюдали в контрольной группе. Разница показателя количества крупных сосудов в контрольной и экспериментальной группе на 20-е сутки отличается почти в 5 раз. Вероятно, небольшое количество сосудов в экспериментальной группе на 20-е сутки свидетельствует о способности вируса прямо или косвенно воздействовать на неоангиогенез развивающейся опухоли, регулируя трофику ткани.

Далее для более точной оценки количества сосудов препараты опухолевой ткани были окрашены на гемопозитический маркер CD34, результаты подсчета численной плотности эндотелиальных клеток с экспрессией CD34 в опухоли животных представлены на гистограмме (Рисунок 12А). Количество сосудов в опухолевой ткани после виротерапии снижено на 5-е и 20-е сутки. Вероятно, небольшое количество сосудов в экспериментальной группе на 20-е сутки свидетельствует о способности вируса прямо или косвенно воздействовать на неоангиогенез развивающейся опухоли, регулируя трофику ткани и способствуя появлению массивных некротических очагов.

Для изучения механизмов торможения неоангиогенеза было проведено исследование с использованием маркера к рецептору фактора роста эндотелия сосудов. Гистограмма (Рисунок 12Б) отражает динамику снижения численной плотности эндотелиальных клеток с экспрессией VEGFR в опухолевой ткани животных после виротерапии штаммом вируса болезни Ньюкасла. На 20-е сутки видно, что сосудов в экспериментальной группе почти в 2,5 раз больше, чем в группе животных после курса виротерапии. Таким образом, можно предположить, что интратуморальные инъекции ВБН способны воздействовать на неоангиогенез опухоли, регулируя трофику развивающейся ткани.

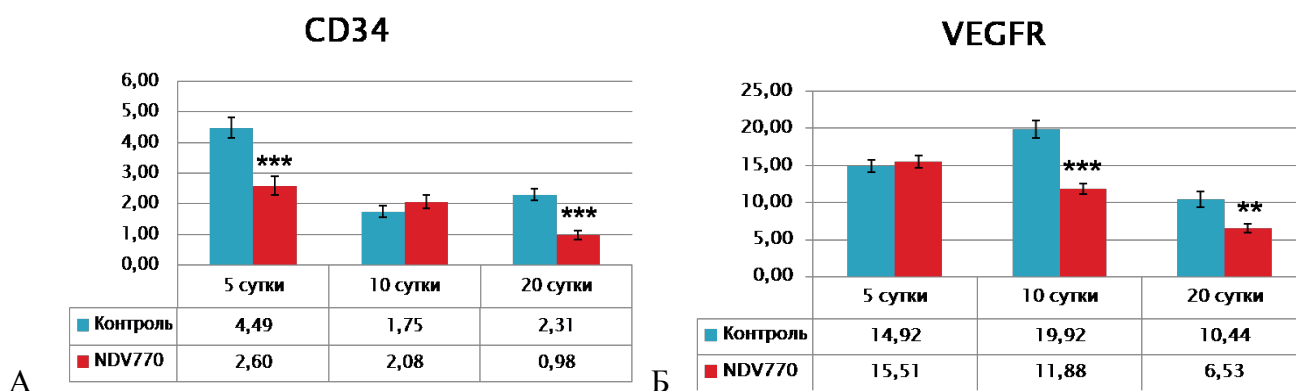


Рисунок 12. Численная плотность эндотелиальных клеток с экспрессией CD34 (А) и VEGFR (Б) в опухолевой ткани карциномы Кребс-2 у мышей без лечения (контроль) и после виротерапии живым вирусом NDV/Altai/pigeon/770/2011 (NDV770). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ относительно контрольной группы.

Обобщение. Эксперименты, проведенные на животной модели экспериментального онкогенеза, были направлены на изучение влияния курса виротерапии инъекциями природного штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на опухолевую прогрессию мышинной карциномы в условиях *in vivo*. Животная модель и способ введения вируса были подобраны в пилотном эксперименте по виротерапии мышинных опухолей карциномы Кребс-2.

Проведена интратуморальная виротерапия штаммом вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 опухолевого солидного внутримышечного узла карциномы Кребс-2 на большой выборке мышей линии BALB/с. По результатам эксперимента получены данные, подтверждающие наличие противоопухолевого потенциала ВБН и дана оценка патоморфологических изменений опухолевой ткани после виротерапии, а также предложен возможный противоопухолевый механизм действия исследуемого природного штамма ВБН.

В контрольных группах животных, не получавших курс виротерапии опухолевый процесс развивался и прогрессировал, в то время как в группах, получавших серию интратуморальных инъекций живого природного штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011, наблюдалось снижение скорости роста опухоли.

На 20-е сутки средний размер опухоли в группе мышей, получавших инъекции живого вируса болезни Ньюкасла, был в 2,6 раз меньше, чем в группе мышей с опухолью, не подвергавшейся виротерапии. В опухолевой ткани обеих групп животных наблюдалась динамика распространения полей некрозов. Отмечается нарастание объемной плотности некрозов в обеих группах животных. Некротические процессы преобладали в контрольной группе на 5-е и 10-е сутки, однако на 20-е поля некрозов в экспериментальной группе значительно расширились по сравнению с контролем. Возможно, что появление обширных полей некрозов в экспериментальной группе может отражать формирование очагов ишемии в опухолевой ткани, появляющихся в результате быстрого развития опухолевого узла и замедленного неоангиогенеза.

Таким образом, интратуморальное введение природного штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 у мышей с карциномой Кребс-2 способствует торможению прогрессии онкогенеза и регрессии опухолевого узла, что выражено в ингибировании роста опухоли. При этом регрессия опухолевого узла обусловлена преимущественно распространением некротических изменений и нарушениями кровоснабжения.

Морфометрический анализ кровеносных сосудов в опухоли экспериментальных животных показал, что число кровеносных сосудов в опухолевой ткани, в том числе и новообразованных, резко снижается к 20-м суткам. Количество сосудов в контрольной группе в среднем больше, чем в экспериментальной группе, что отражает неоангиогенез в опухолевой ткани.

Таким образом, вероятно, небольшое количество сосудов в экспериментальной группе на 20-ые сутки свидетельствует о способности вируса прямо или косвенно воздействовать на неоангиогенез развивающейся опухоли, регулируя трофику ткани и тем самым воздействуя на

торможение прогрессии опухоли. Вероятно, интратуморальные инъекции штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 замедляют процессы неоангиогенеза в опухолевой ткани, одним из механизмов которого может быть блокада рецепторов фактора роста эндотелия сосудов VEGFR.

Заключение. Использование непатогенного штамма вируса болезни Ньюкасла с природными высокими онколитическими свойствами делает вирус привлекательным в качестве противоопухолевого агента. Вместе с тем использование природных штаммов ВБН является одновременно и безопасным, и экономически выгодным, по сравнению с использованием модифицированных рекомбинантных штаммов, требующих дополнительных мер по генетическому контролю вирусных препаратов. Исследование природных изолятов и их онколитических свойств позволяют выявить новые перспективные для клинической онкологии штаммы и в дальнейшем использовать их для изучения в качестве кандидатов для разработки вирусных препаратов.

В настоящей работе было использовано 44 природных штамма из коллекции изолятов вируса болезни Ньюкасла, сформированной ранее по результатам полевых работ на территории Западной Сибири и Дальнего Востока с 2008 по 2014 годы. Из 44 имеющихся изолятов только 28 нарабатывались в высоких титрах (≥ 32 ГАЕ/50мкл), подходящих для осуществления дальнейшей работы по инфицированию клеток и проверки онколитического потенциала. Для сравнения противоопухолевого потенциала было решено использовать гемагглютинирующие единицы для подсчета доз при инфицировании клеток. Большинство из исследуемых природных изолятов ВБН демонстрирует онколитический потенциал на опухолевых клеточных линиях человека различного происхождения (линии клеток колоректальной карциномы HCT116, карциномы шейки матки HELA и немелкоклеточной карциномы легкого A549). При этом наибольшую резистентность к онколитическому действию природных изолятов вируса демонстрирует опухолевая линия аденокарциномы молочной железы MCF7. Показаны различия чувствительности разных опухолевых клеточных линий к онколитическому действию разных природных штаммов ВБН. Таким образом, в результате настоящего исследования получены данные, анализ которых показал наличие онколитического потенциала у двух природных штаммов ВБН, выделенных на территории РФ, - штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011 и штамм NDV/Yakutia/mallard/852/2011, цитопатическое действие которых было описано ранее, и пяти новых ранее не исследованных штаммов – NDV/mallard/Amur/264/2009, NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010, NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010, NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010 и NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2010.

В эксперименте по интратуморальной виротерапии штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 перевитой внутримышечно в бедро задней лапы мышей линии BALB/c клеток карциномы Кребс-2 рост объемной плотности некрозов в опухолевой ткани в динамике на первых и на последующих сроках морфологического исследования препаратов можно считать результатом ишемического некроза при быстро и агрессивно развивающейся опухоли. Однако, учитывая это, на фоне курса виротерапии штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 к 5-ым суткам отмечается высокий уровень показателя плотности некрозов по сравнению с контрольными нелечеными опухолями.

Показатель численной плотности сосудов в опухолевой ткани на ранних и поздних сроках после виротерапии значительно снижен по сравнению с не лечеными животными, что связано с возможным механизмом воздействия вируса на процессы неоангиогенеза в ткани и как следствие на распространение массивных некротических очагов в опухолевой ткани наряду с агрессивным ростом опухоли Кребс-2.

Было установлено, что проведение курса виротерапии интратуморальными инъекциями штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 сопровождалось нарастанием деструктивных изменений в опухолевой ткани Кребс-2, объемной плотности некротических очагов и численной плотности эндотелиальных клеток с экспрессией CD34 и VEGFR, что в совокупности с динамикой роста опухолевого узла леченных животных в сравнении с контрольными животными свидетельствует

о том, что в процессе интратуморальных инъекций вируса болезни Ньюкасла происходит процесс снижения опухолевой прогрессии исходно агрессивной опухоли.

В результате проведенного исследования можно сделать заключение, что штаммы вируса болезни Ньюкасла, выделены от диких птиц, обладают природными онколитическими свойствами. Очевидно, что вышеописанные результаты предполагают перспективность использования вируса болезни Ньюкасла в качестве противоопухолевого агента, воздействующего на опухолевые клетки и ткани, вызывая их гибель. Полученные данные позволяют предложить штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011 для дальнейшего исследования как онколитического средства, противоопухолевый механизм действия которого требует дальнейших исследований.

Выводы. 1. Из 44 диких штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от мигрирующих птиц на территории Российской Федерации в период 2008-2014 гг., 17 штаммов проявляют цитотоксический эффект относительно клеток карциномы толстой кишки HCT116+/+, карциномы шейки матки HeLa и немелкоклеточной карциномы легкого A549, из них 7 штаммов оказывают выраженное цитотоксическое действие на исследуемые опухолевые линии человека, снижение жизнеспособности которых составляет 50-80% после инфицирования.

2. Все исследованные дикие штаммы вируса болезни Ньюкасла не оказывают цитотоксического действия на здоровые клетки человека (МНПК) – жизнеспособность клеток в течение 96-ти часов после инфицирования составляет выше 94%, что свидетельствует об онкоселективных данных штаммов.

3. Голубиный штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011 обладает наибольшей онколитической активностью в отношении клеток карцином HCT116+/+, HeLa и A549 (снижение клеточной жизнеспособности более 62%, 78% и 60%, соответственно). В экспериментах *in vivo* на модели мышины карциномы Кребс-2 голубиный штамм в 2,6 раз ингибировал рост солидного опухолевого узла при интратуморальном введении, а в отдельных случаях индуцировал почти полную регрессию опухоли.

4. Выявлено, что основные деструктивные изменения в ткани карциномы Кребс-2 при интратуморальной виротерапии штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 связаны с некрозоподобными изменениями, опережающие по масштабам рост опухолевого узла.

5. Введение вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 способствует ингибированию ангиогенеза в опухолевой ткани, что выражается в значимом снижении численности сосудов на ранних и поздних сроках виротерапии, уменьшении плотности клеток с гемопозитическим маркером CD34 и блокаде рецепторов фактора роста эндотелия сосудов VEGFR. Реализация антиангиогенных свойств вируса вносит вклад в развитие ишемии, последующего некроза и торможения прогрессии опухоли.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Yurchenko K.S.** Complete genome sequence of a Newcastle disease virus isolated from a rock dove (*Columba livia*) in the Russian Federation / **Yurchenko K.S.**, Sivay M.V., Glushchenko A.V., Alkhovsky S.V., Shchetinin A.M., Shchelkanov M.Y., Shestopalov A.M. // Genome Announcements. – 2015. – Vol.3. - №1. – P. e01514-14. - DOI: [10.1128/genomeA.01514-14](https://doi.org/10.1128/genomeA.01514-14).

2. **Yurchenko K.S.** Complete genome sequence of genotype IB Newcastle disease virus isolated from a mallard (*Anas platyrhynchos*) in Russia / **Yurchenko K.S.**, Sobolev I.A., Glushchenko A.V., Shestopalov A.M. // Genome Announcements. – 2015. – Vol.3. - №6. – P. e01414-15. - DOI: [10.1128/genomeA.01414-15](https://doi.org/10.1128/genomeA.01414-15).

3. **Юрченко К.С.** Онколитические свойства вируса болезни Ньюкасла / **Юрченко К.С.**, Губанова Н.В., Шестопалова Л.В., Щелканов М.Ю., Шестопалов А.М. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. - №3(61). – С.14-18.

4. Глущенко А.В. О роли диких птиц в сохранении и распространении птичьего парамиксовируса серотипа 1 (вирус болезни Ньюкасла) на территории Сибири и Дальнего

Востока, Россия / Глущенко А.В., **Юрченко К.С.**, Юрлов А.К., Юшков Ю.Г., Шестопапов А.М. // Юг России: экология, развитие. – 2016. – Том.11 - №.2 – С.50-58. doi: 10.18470/1992-1098-2016-2-50-58.

5. Kabilov M.R. Complete Genome Sequences of Two Newcastle Disease Virus Strains Isolated from a Wild Duck and a Pigeon in Russia / Kabilov M.R., Alikina T.Y., **Yurchenko K.S.**, Glushchenko A.V., Gunbin K.V., Shestopalov A.M., Gubanova N.V. // Genome Announc. – 2016. – Vol.4(6). pii: e01348-16. doi: 10.1128/genomeA.01348-16.

6. Sobolev I.A. Characterization of avian paramyxovirus type 6 isolated from a Eurasian teal in the intersection of migratory flyways in Russia / . Sobolev I.A., Sharshov K., **Yurchenko K.**, Korneev D., Glushchenko A., Alikina T., Kabilov M., Bi Y., Liu W., Gubanova N., Shestopalov A. // Arch Virol. – 2016. – Vol.161(11). P.3275-3279. doi: 10.1007/s00705-016-3029-y.

7. Yurchenko K.S. Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model / **Yurchenko K.S.**, Zhou P., Kovner A.V., Zavjalov E.L., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M. // PLoS One. – 2018. - Vol. 13 (4). – P. e0195425. doi: 10.1371/journal.pone.0195425.

Тезисы конференций:

1. Юрченко К.С. Исследование онколитических свойств вируса болезни Ньюкасла / **Юрченко К.С.**, Губанова Н.В., Шестопапов А.М. // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: Материалы IV Международной Интернет-конференции в 2 томах – 2013, Казань. – С.166-168.

2. Глущенко А.В. Скрининг биологических свойств природных вариантов вируса болезни Ньюкасла для их использования в биотехнологии / Глущенко А.В., **Юрченко К.С.**, Шаршов К.А., Шестопапов А.М. // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: Материалы IV Международной Интернет-конференции – 2013, Казань. – С.66-67.

3. **Юрченко К.С.** Изучение онколитических свойств природных изолятов вируса болезни Ньюкасла / **Юрченко К.С.**, Глущенко А.В., Губанова Н.В., Ромащенко А.В. // Сибирский онкологический журнал. – 2014. - №S1. – С.133-134.

4. Глущенко А.В. Создание коллекции вируса болезни Ньюкасла для разработки противоопухолевых препаратов / Глущенко А.В., **Юрченко К.С.**, Шаршов К.А., Шестопапов А.М. // Наука и образование в XXI веке: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции – 2014, Тамбов. – С.25-26.

5. **Юрченко К.С.** Распределение и локализация штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 в опухолевых клеточных линиях человека / **Юрченко К.С.**, Глущенко А.В., Шестопапов А.М., Забелин В.А. // Наука и образование в XXI веке: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции – 2014, Тамбов. – С.162-163.

6. **Yurchenko K.S.** The study of oncolytic properties of Newcastle disease virus strains isolated from birds / **Yurchenko K.S.**, Glushchenko A.V., Romashchenko A.V., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M., Gubanova N.V. // Human Gene Therapy: 8th International Conference on Oncolytic Virus Therapeutics. - 2014 – Vol.25. – P.A9-A10. - DOI: 10.13140/RG.2.1.3137.3929.

7. **Yurchenko K.S.** In vitro oncolytic effects of wild Newcastle disease virus strains and results in vivo virotherapy // **Yurchenko K.S.**, Glushchenko A.V., Belogorodtsev S.N., Kovner A.V., Shestopalova L.V., Potapova O.V., Shestopalov A.M. // European journal of cancer supplements. – 2015. - Vol.13. – №1. – P.67. - DOI: [10.1016/j.ejcsup.2015.08.119](https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2015.08.119).

8. Белгородцев С.Н. Влияние онколитического вируса Ньюкасла на течение опухолевого процесса у мышей / Белгородцев С.Н., **Юрченко К.С.**, Кащенко Э.А. // Медицинская иммунология. – 2015. – Том.17. - №S. – С.232.

9. Глущенко А.В. Изучение циркуляции вируса болезни Ньюкасла у диких птиц на территории Западной Сибири и Дальнего Востока / Глущенко А.В., **Юрченко К.С.**, Шестопапов А.М. // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы Седьмой всероссийской научно-практической конференции – 2015, Новосибирск. – С.47-48.

10. Глущенко А.В. Мониторинг вируса болезни Ньюкасла у диких перелетных птиц на территории Западной Сибири и Дальнего Востока / Глущенко А.В., **Юрченко К.С.**, Шестопапов А.М. // Перспективы развития науки и образования: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции – 2015, Тамбов. – С.43.

11. Глущенко А.В. Скрининг биологических свойств природных вариантов вируса болезни Ньюкасла для их использования в биотехнологии / Глущенко А.В., Шаршов К.А., **Юрченко К.С.**, Шестопапов А.М. // Вопросы образования и науки: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции – 2015, Тамбов. – С.36-37.

12. **Юрченко К.С.** Исследование опухолевой прогрессии карциномы Кребс-2 после курса виротерапии вирусом болезни Ньюкасла / **Юрченко К.С.**, Ковнер А.В., Шишкина Е.Ю. // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы Седьмой всероссийской научно-практической конференции – 2015, Новосибирск. – С.335-336.

13. **Юрченко К.С.** Локализация вируса болезни Ньюкасла при экспериментальной инфекции опухолевых клеточных линий человека / **Юрченко К.С.**, Шаршов К.А., Глущенко А.В., Шестопапов А.М., Забелин В.А. // Наука и образование в жизни современного общества: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции – 2015, Тамбов. – С.163-164.

14. **Yurchenko K.S.** Different oncolytic activities of wild type Newcastle disease virus strains on HeLa cell line / **Yurchenko K.S.**, Zhou P., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M. // Fundamental science and technology – promising developments – 2015, North Charleston. – P.1-3.

Патенты:

1. Патент 2562115 Российская Федерация, МПК C12N 7/00, A61K 39/17, A61P 35/00. Штамм вируса болезни Ньюкасла для изучения онколитических свойств и механизмов онколизиса для создания прототипного противоопухолевого препарата / **Юрченко К.С.**, Шестопапова Л.В., Глущенко А.В., Шкурупий В.А., Шестопапов А.М.; заявители и патентообладатели ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (Новосибирский государственный университет, НГУ), ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (НИИЭКМ).- №2014145677/10; заявл. 13.11.2014; опубл. 10.09.2015, Бюл. № 25.

2. Патент 2590718 Российская Федерация, МПК C12N 15/11, C12N 7/00, C12Q 1/68. Набор олигонуклеотидов-праймеров для получения первичной структуры F гена вирусов болезни Ньюкасла класса I / Сивай М.В., Шаршов К.А., **Юрченко К.С.**, Забелин В.А., Шестопапов А.М.; заявители и патентообладатели ООО «Витагор», ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (Новосибирский государственный университет, НГУ).- №2015122913/10; заявл. 15.06.2015; опубл. 10.07.2016, Бюл. № 19.

3. Патент 2644676 Российская Федерация, МПК C12N 7/00, A61K 39/17. Штамм вируса болезни Ньюкасла NDVH-2 для изучения возможности разработки на его основе вирусного онколитического препарата / Губанова Н.В., **Юрченко К.С.**, Глущенко А.В., Шаршов К.А., Змиевский А.В., Шестопапов А.М.; заявители и патентообладатели Общество с ограниченной ответственностью «Витагор» (ООО «ВИТАГОР»), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ ИЦиГ СО РАН).- №2016141015; заявл. 18.10.2016; опубл. 13.02.2018, Бюл. № 5.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук, профессору Шестопапову Александру Михайловичу за помощь в организации работы и поддержку на всех этапах ее выполнения.

Автор выражает глубокую признательность к.б.н. Губановой Наталье Владимировне и Глущенко Александре Владимировне за практическую и консультативную помощь, оказанную в ходе выполнения данной работы.

Искреннюю благодарность автор выражает коллективу лаборатории структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний НИИЭКМ ФИЦ ФТМ и лично к.б.н. Ковнер Анне Владимировне за всестороннюю поддержку и помощь при проведении исследования.