

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»**

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Шестопапов А.М.

Санкт-Петербург
2019

СОДЕРЖАНИЕ:

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Биология опухолей	12
1.2. Подходы к лечению злокачественных новообразований и современный вектор развития методов онкотерапии	14
1.3. ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	16
1.4. ДОСТИЖЕНИЯ ВИРОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	21
1.5. ВИРУС БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КАНДИДАТ НА РОЛЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АГЕНТА И ОБОСНОВАНИЕ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В КОНЦЕПЦИИ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ ВИРОТЕРАПИИ	26
<i>Биология вируса болезни Ньюкасла.....</i>	26
<i>Голубиный парамиксовирус серотипа 1 (PPMV-1)</i>	27
<i>Строение вируса болезни Ньюкасла.</i>	28
<i>Репликация вируса болезни Ньюкасла.....</i>	29
<i>ВБН в концепции вирусной терапии рака.....</i>	31
<i>Вирус болезни Ньюкасла как онколитический агент.....</i>	37
<i>Рекомбинантные штаммы вируса болезни Ньюкасла.....</i>	40
<i>Механизм противоопухолевого действия вируса болезни Ньюкасла</i>	42
<i>Опухолевый неоангиогенез и онколитические вирусы в качестве антиангигенных терапевтических агентов</i>	54
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	76
3.1. ВЫБОР СИСТЕМЫ НАРАБОТКИ И ПОДГОТОВКА ПРЕПАРАТИВНОГО КОЛИЧЕСТВА ШТАММОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА.	76
3.2. ОЦЕНКА ИНФЕКЦИОННОГО ТИТРА ШТАММОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА.	80
3.3. ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	86
3.3.1. <i>Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток карциномы толстой кишки НСТ116.....</i>	87
3.3.2. <i>Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток эпидермоидной карциномы рака шейки матки HeLa.....</i>	89
3.3.3. <i>Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток немелкоклеточной карциномы легкого A549.....</i>	90
3.3.4. <i>Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток аденокарциномы молочной железы MCF7.....</i>	92
3.4. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ШТАММОВ ВБН НА НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ МТТ.....	94
3.5. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА ШТАММОВ ВБН, ПРОЯВЛЯЮЩИХ ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ <i>IN VITRO</i>	95
3.6. ПОЛУЧЕНИЕ КРОЛИЧЬИХ ПЕРВИЧНЫХ АНТИТЕЛ К ШТАММУ NDV/ALTAI/PIGEON/770/2011.....	97

3.7. Иммуноцитохимический анализ клеток опухолевых линий человека, инфицированных штаммом NDV/ALTAI/PIGEON/770/2011	98
3.8. Оценка жизнеспособности клеток мышшиной асцитной опухоли КРЕБС-2 в эксперименте <i>IN VITRO</i>	101
3.9. Исследование безопасности штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/ALTAI/PIGEON/770/2011 в экспериментах на животных.....	102
3.9.1. Исследование острой токсичности при внутривенном введении вируса.....	103
3.9.2. Выявление особенностей влияния вируса болезни Ньюкасла на ткани здоровых органов при однократном внутривенном введении штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011.....	104
3.10. Исследование противоопухолевой активности природного штамма NDV/ALTAI/PIGEON/770/2011 на опухолевую прогрессию солидного узла мышшиной карциномы КРЕБС-2.....	106
3.10.1. Пилотный эксперимент <i>in vivo</i> на мышшах линии BALB/C.....	106
3.10.2. Оценка патоморфологических особенностей опухолевой ткани после курса виротерапии в пилотном эксперименте <i>in vivo</i> на мышшах линии BALB/C. Оценка иммунного статуса организма под воздействием виротерапии.....	108
3.10.3. Исследование противоопухолевой активности природного штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на опухолевую прогрессию солидного узла мышшиной карциномы Кребс-2.....	111
3.10.4. Оценка патоморфологических особенностей опухолевой ткани после курса виротерапии. Оценка иммунного статуса организма под воздействием виротерапии	113
3.10.5. Сравнительный анализ опухолей, полученных от нелеченных животных и от животных после виротерапии, с использованием гистологических, иммуногистологических, морфометрических методов оценки	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
ВЫВОДЫ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- APMV-1 – птичий парамиксовирус серотипа 1
- IFNAR (interferon alpha/beta receptor) - рецепторы интерферона α/β
- PPMV-1 (pigeon paramyxovirus type 1) – голубиный парамиксовирус серотипа 1
- RDE (receptor destroying enzyme) – фермент, разрушающий ингибиторы неспецифической
гемагглютинации в сыворотке крови
- TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) – 50%-ая инфекционная доза для культуры клеток
- VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) – рецептор эндотелиального фактора роста
сосудов
- БН – болезнь Ньюкасла
- ВБН – вирус болезни Ньюкасла
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ГАЕ – гемагглютинирующая единица
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДМЕМ – питательная среда Игла, модифицированная Дульбеко
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- МЕМ – питательная среда Игла с минимальным содержанием незаменимых аминокислот
- МНПК – мононуклеарные клетки периферической крови человека
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого
- ПЦР — полимеразная цепная реакция
- РГА – реакция гемагглютинации
- РТГА – реакция торможения гемагглютинации
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ЦПД – цитопатическое действие

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Несмотря на интенсивное развитие методов молекулярной и клеточной биологии, а также способов ранней диагностики и комплексной терапии злокачественных новообразований, в целом по статистике 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 опухолевых клеток и распространение вирусного потомства на соседние раковые клетки. Кроме того помимо непосредственного лизиса раковых клеток онколитические вирусы способны вызывать активацию иммунного ответа организма посредством стимулирования выработки интерферонов и фактора некроза опухоли (TNF). Повышение уровня цитокинов приводит к активации в организме цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), макрофагов и естественных киллеров (NK) (Jarahian, 2009; Wong, 2010). 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 опухолевые 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 в клинических испытаниях были получены многообещающие результаты, включая результаты лечения пациентов, страдающих от рака, устойчивого к действию традиционных методов лечения. На данный момент 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: Кешелова 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 мышью карциномой Кребс-2.

3. Интратуморальная виротерапия штаммом вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 мышью 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).

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 Минобрнауки 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. Нароботка 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биология опухолей

Опухолевые новообразования представляют собой большую группу заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом и пролиферацией клеток, что приводит к патологическому разрастанию ткани. Злокачественная трансформация может затронуть клетки организма различной этиологии и гистогенеза, что обуславливает многообразие имеющихся форм онкологических заболеваний. Однако для клеток всех многочисленных форм новообразований характерны общие отличительные свойства опухолевого атипизма, заключающиеся в наличии аномальных признаков роста и деления, изменении метаболизма с преобладанием анаболических реакций в опухолевой ткани, отличии структуры и формы клеток опухоли от клеток аутологичной ткани, распространении по организму (метастазирование) и нарушении функционирования пораженных тканей и органов в целом (Weinberg, 2007).

Причинами опухолевой трансформации клеток организма служат генетические нарушения, которые затрагивают гены, регулирующие механизмы клеточного цикла, пролиферации, дифференцировки и апоптоза. У человека нарушения, приводящие к развитию новообразований, затрагивают 291 ген, что составляет всего лишь 1,5% генома (Weinberg, 2007). При этом согласно полиэтиологической теории развития опухоли немаловажную роль в процессе малигнизации играют факторы экзогенной природы, обуславливающие развитие опухолевого роста в 80% случаев заболевания (Parsa, 2012). Помимо факторов биологической природы (онкогенные вирусы и паразитарное воздействие) к экзогенным относят факторы химической (промышленные канцерогены, медикаменты, потребление табака, нарушение условий приготовления пищи и гигиены питания) и физической природы (радиоактивное, рентгеновское, ультрафиолетовое излучения).

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в структуре причин смертности среди неинфекционных заболеваний опухолевые новообразования занимают второе место после сердечно-сосудистых заболеваний. Тенденция роста уровня заболеваемости и смертности сохраняется уже на протяжении нескольких десятилетий, при этом ВОЗ прогнозирует дальнейший рост общего уровня заболеваемости на 70% к 2035 году по сравнению с данными 2012 года (Рисунок 1).

Несмотря на то, что рак принято называть болезнью развитых стран за счет увеличения продолжительности жизни населения, на сегодняшний день широкое распространение негативных экзогенных факторов привело к тому, что уже 57% всех случаев онкологических заболеваний регистрируются в экономически неразвитых и развивающихся странах (WCRF, 2018; WHO, 2018a).

Уровень заболеваемости (впервые выявленные случаи) и смертность от онкологических новообразований в мире, млн. человек

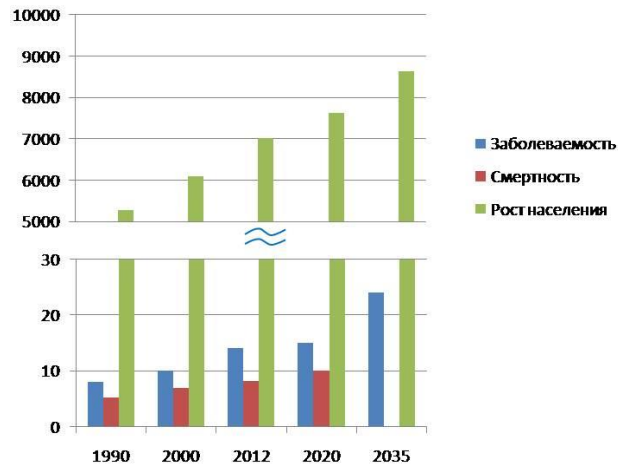


Рисунок 1. Рост заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний в мире в сравнении с приростом населения мира (WHO, 2018).

По численности впервые диагностированных опухолей, а также по смертности среди онкологических пациентов лидирует рак легких. Второе и третье место занимает рак молочной железы и колоректальный рак (Рисунок 2). В профиле заболеваемости и смертности от рака в России ситуация схожа с мировой статистикой.

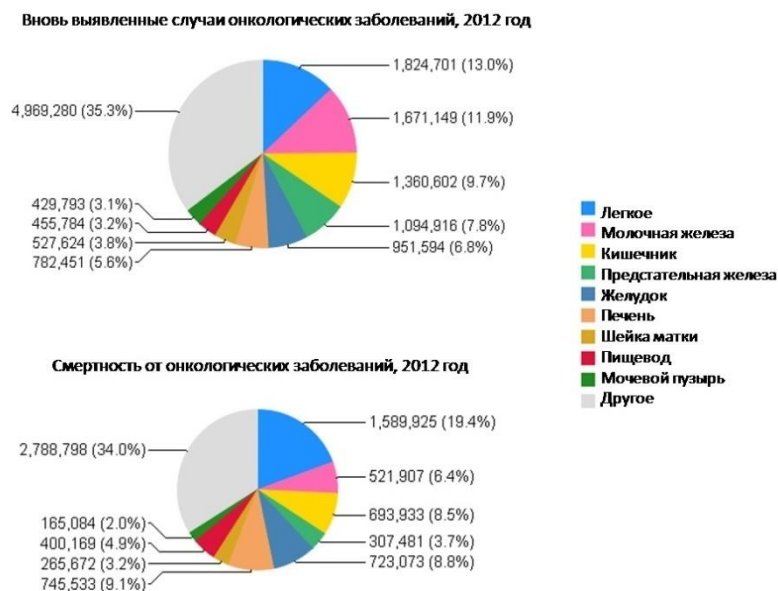


Рисунок 2. Профиль заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний в мире за 2012 год (WHO, 2018).

Таким образом, проблема поиска эффективного метода лечения онкологических заболеваний, разработки и создания доступных противоопухолевых препаратов для онкотерапии остаются приоритетными направлениями для современной медицины и биологии.

1.2. Подходы к лечению злокачественных новообразований и современный вектор развития методов онкотерапии

Значительный прогресс развития методологической базы и получение новых фундаментальных знаний в области медико-биологических наук на рубеже XX и XXI веков предоставили возможность для усовершенствования традиционных и разработки новых методов диагностики и лечения опухолей. Благодаря предложенным современным технологиям и новым терапевтическим подходам уже удалось добиться повышения эффективности лечения и увеличения шансов человека на выздоровление при некоторых типах опухолевых заболеваний.

В области диагностики опухолей предстательной железы большие успехи были достигнуты при высокоточном ультразвуковом исследовании тканей методом гистосканирования, который позволил выявлять болезнь на ранней стадии развития (Labanaris, 2012). Усовершенствование метода и системы оценки тонкоигольной биопсии ТАПБ под контролем УЗИ привело к возможности своевременного выявления и прогнозирования рака щитовидной железы (Misiakos, 2016). Большой прогресс достигнут в лечении отдельных форм рака молочной железы за счет всестороннего изучения механизмов развития этого заболевания и применения препаратов таргетной терапии для ER- и Her-2-позитивных опухолей и для агрессивной формы трижды негативного рака груди (den Hollander, 2013).

Классическое лечение онкологических заболеваний по-прежнему базируется на хирургическом удалении опухоли целиком или в ходе циторедуктивных и паллиативных операций, лучевой терапии с использованием ионизирующего излучения и применении химиотерапевтических препаратов, а также всевозможных комбинаций перечисленных методов. Однако новые современные технологии малоинвазивного лечебного воздействия на опухоли существенно расширили возможности традиционных методов терапии.

Хирургическое лечение теперь дополняется криохирургией, при которой для уничтожения опухоли используют низкотемпературное воздействие смеси газов для повреждения атипичных клеток – эффективное для лечения на ранних стадиях опухоли предстательной железы (Donis Canet, 2017), рака шейки матки (Firnhaber, 2017) и опухолей ЖКТ (Tsai, 2017). Среди других малоинвазивных современных методов в качестве примера можно привести фотобиомодуляцию (лазер-индуцированную термотерапию), радиочастотную абляцию и совсем неинвазивную технологию HIFU, направленную на разрушение опухоли за счет воздействия фокусированным ультразвуком высокой энергии (Maloney, 2015; Ottaviani, 2016).

Усовершенствование методов лучевой терапия непосредственно связано с прогрессом в области радиобиологии и физики излучений и направлено преимущественно на поиск и внедрение технологий, которые позволили бы достигать максимальной концентрации лучевой дозы при минимальном воздействии на здоровые ткани. Таким образом, появились новые методы модуляции интенсивности пучка (IMRT) для дистанционного воздействия на опухоли и контактная терапия, при которой источник излучения подводится максимально близко к опухоли или помещается непосредственно в пораженный орган (брахитерапия). Методы успешно применяются для терапии опухолей головы и шеи и рака простаты (Frank, 2018; Toyota, 2017).

Прогресс в робототехнике позволил создать радиохирургическую систему Кибернож (CyberKnife), которой можно управлять при помощи манипулятора и направлять излучение роботизированной рукой с установленным ускорителем практически во все органы с самыми труднодоступными опухолями (CyberKnife, 2018), что, однако, сопряжено с большим риском возникновения осложнений, связанных с нарушением целостности тканей, приводящих к летальным случаям (Kodani, 2011).

Новые возможности в области фотодинамической терапии (ФТ) опухолей предлагают ученые-химики, создавая сложносоставные биосовместимые фотосенсибилизаторы (ФС) для оптимизации процесса обнаружения и отслеживания накопления препарата в организме и усиления терапевтической эффективности ФТ. Примером такого ФС служат модифицированные кластеры на основе молибдена и рения с частицами диоксида кремния в качестве носителя, безопасность и эффективность которых уже проверена на клетках Hep-2 и HeLa и в доклинических испытаниях на животных (Krasilnikova, 2015; Solovieva, 2017).

Вектор современных исследований в области разработок химиотерапевтических препаратов и схем их применения направлен преимущественно на борьбу с тяжёлыми осложнениями и побочными явлениями, полученными пациентами в ходе химиотерапии. Проблема заключается в том, что среди широкого многообразия достаточно эффективных химиотерапевтических препаратов все они по-прежнему обладают высокой токсичностью, что ограничивает их лечебный противоопухолевый потенциал. Поэтому при подборе препарата и схемы курсов сложно прогнозировать не только чувствительность разного типа опухолей у каждого конкретного человека в ответ на химиотерапию, но и характер ответной реакции нормальных клеток организма, в особенности чувствительных к препаратам клеток-предшественников крови, слизистых ЖКТ и дыхательной системы.

Сейчас цитостатическая химиотерапия по-прежнему широко применяется в качестве основного метода лечения гемобластозов, а также в комплексном лечении в качестве дополнительного воздействия на опухолевые клетки в виде неоадьювантной и адьювантной терапии, цель которой уменьшить размер опухоли перед хирургической операцией и остановить

метастазирование и убить оставшиеся раковые клетки после удаления опухоли. Тем не менее, научные разработки все больше сдвигаются в область таргетной химиотерапии, которая позволяет минимизировать токсическое воздействие на организм. Результатом разработок стали новые терапевтические препараты и методики, направленные на избирательность воздействия против опухоли и повышение безопасности для здоровых клеток (Mu, 2018). Среди наиболее известных препаратов цитостатик Иматиниб, успешно ингибирующий тиразинкиназу и подавляющий пролиферацию BCR-ABL-позитивных опухолевых клеток, в которых активация онкогена приводит к развитию хронического миелолейкоза. Другой препарат Ритуксимаб представляет собой синтетическое моноклональное антитело (IgG), специфически связывающееся с трансмембранным антигеном CD20 на поверхности В-лимфоцитов, вызывая иммунологические цитотоксические реакции при В-клеточных неходжкинских лимфомах. Однако, несмотря на хороший терапевтический эффект, и Иматиниб, и Ритуксимаб требуют доработки, так как в первом случае большинство пациентов с хроническим миелолейкозом после лечения сталкиваются с рецидивом из-за наличия в костном мозге остаточных опухолевых клеток (Corbin, 2011), а в другом помимо рецидива болезни у пациентов появляется приобретенная резистентность к действию препарата (Jazirehi, 2007).

Несмотря на отдельные успехи традиционных методов лечения в области онкотерапии и снижения смертности от некоторых видов злокачественных новообразований, оказалось, что классических способов терапии не достаточно для эффективного лечения. По данным на 2001 год онкология находилась на последнем месте по эффективности терапии среди ряда социально значимых заболеваний (Speag, 2001). Хирургическое удаление опухоли и лучевая терапия зачастую остаются малоэффективными методами лечения в случае неоперабельных, труднодоступных и метастазирующих опухолей, а также в случаях выявления онкологических заболеваний на поздних стадиях развития. Хирургическое вмешательство имеет достаточно высокий уровень возможных осложнений и нарушений вплоть до летальных случаев. Потенциальная эффективность химиотерапии практически достигла своего предела и требует оптимизации избирательности и безопасности препаратов для здоровых клеток организма.

1.3. Таргетная терапия онкологических заболеваний

Полученные за последние 20 лет фундаментальные знания о молекулярных механизмах злокачественной трансформации, роста, пролиферации опухолевых клеток и процессах взаимодействия опухоли с клеточным микроокружением способствовали появлению новых экспериментальных методов терапии опухолей, многие из которых уже дошли до стадии клинических испытаний и одобрены для использования в клинической практике. Среди широко исследуемых разработок - новый класс специфических «молекулярно-прицельных» препаратов, в

основе действия которых лежат принципы целевого воздействия на известные молекулярные процессы, происходящие в опухолевой ткани (Tsimberidou, 2015).

Принцип действия одних таргетных препаратов (с цитотоксическим эффектом) направлен на активацию гибели опухолевых клеток, практически не оказывая неблагоприятного воздействия на здоровые ткани организма, и, следовательно, не вызывая системных побочных эффектов, свойственных химио- и лучевой терапии. Другие (с цитостатическим эффектом) сдерживают опухолевый рост и способствуют торможению опухолевой прогрессии, ингибируя пролиферацию и передачу сигналов к делению клеток или же контролируя процесс клеточной дифференцировки и, таким образом, переводя заболевание в хроническое течение. Отдельная группа препаратов представляет собой векторные системы для транспортировки активных компонентов (биологических, химических, радиоактивных) непосредственно в ткани опухоли, где они реализуют свой противоопухолевый потенциал.

Помимо блокирования передачи митогенных и антиапоптотических сигналов отдельная категория таргетных препаратов опосредованно воздействуют на опухолевый рост путем блокады микроокружения в опухолевой ткани, а именно процесса ангиогенеза. Блокирование молекулярных сигналов препятствует росту новых сосудов и/или способствует прямому повреждению сосудов, которые нужны для питания опухоли, вследствие чего нарушается кровоснабжение новообразования и происходит прекращение роста и обратное развитие опухоли. В антиангиогенной терапии наиболее широкое распространение получил препарат бевацизумаб, на основе синтетических гиперхимерных моноклональных антител (МКА), которые селективно связываются с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и препятствуют взаимодействию с рецепторами Flt-1 и KDR на поверхности эндотелиальных клеток. Применение бевацизумаба дает хороший общий ответ на противоопухолевую терапию метастатического колоректального рака (33,5%) (Qu, 2015), НМРЛ III и IV стадий (35%, в комбинации с химиотерапией) (Russo, 2017), метастатического рака молочной железы (более 20% в комбинации с химиотерапией) (Li, 2017) и глиобластомы (28,2% при монотерапии) (Friedman, 2009) с улучшением выживаемости без прогрессирования опухолевого развития.

Подавляющее большинство таргетных препаратов использует для реализации избирательного противоопухолевого действия рецепторы опухолевых клеток. На всех клетках, в том числе и опухолевых, есть рецепторы, которые состоят из трех частей – экстрацеллюлярного внеклеточного домена, ответственного за связывание с факторами роста, трансмембранного домена и интрацеллюлярного внутриклеточного домена, с которого запускается передача сигнала на внутриклеточные белки. Активация рецепторов опухолевой клетки приводит к стимуляции механизмов выживания клеток, пролиферации, метастазирования и ангиогенеза в опухолевой ткани. Внеклеточный домен рецепторов опухолевых клеток научились блокировать

синтетическими антителами, препятствуя связыванию рецептора с природным лигандом, или перехватывая сам лиганд, не позволяя ему связаться с рецептором. Для воздействия на трансмембранный домен пока не нашли препаратов. Внутриклеточный домен, как правило, блокируют ингибиторами тирозинкиназы, нарушая внутриклеточную передачу сигнала от рецептора. Также отдельные препараты блокируют внутриклеточные белки, участвующие в передаче сигнала роста, пролиферации и дифференцировки к ядру опухолевой клетки.

Значительный сегмент имеющихся таргетных препаратов по своей природе представлен антителами и низкомолекулярными ингибиторами. Первые являются продуктом генной инженерии и представляют собой синтетические химерные иммуноглобулины к факторам роста и их рецепторам – в основном к семейству эпидермальных факторов роста HER или ErbB (трастузумаб, цетуксимаб), а также к трансмембранному антигену CD20 (ритуксимаб) и к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF) (бевацизумаб) (Coulson, 2014). Малые молекулы ингибиторы тирозинкиназы – исключительно таблеточные препараты, которые блокируют внутриклеточный домен рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), фактора стволовых клеток, тромбоцитарного фактора роста (эрлотиниб, gefитиниб, иматиниб, сунитиниб, сорафениб) (Gallick, 2012). Отдельная группа таргетных препаратов представлена конъюгатами МКА и цитостатиков. Примером служит трастузумаб-DM1, применяющийся при лечении HER2/neu-позитивном раке молочной железы, где DM1 – высоко эффективный цитостатик, но сам по себе вызывает очень токсические реакции. Методами генной инженерии несколько молекул цитостатика пришиваются к МКА, которое находит рецептор на опухолевой клетке, присоединяется, при этом образовавшийся комплекс попадает в клетку, а молекулы цитостатика специфически доставляются к клетке без появления системной токсичности (Bartsch, 2015; Lu, 2014).

Среди прочих таргетных препаратов есть ингибиторы разных белков химической природы – эверолимус (ингибитор серин-треониновой протеинкиназы mTOR) (Saran, 2015), модифицированная борная кислота бортезомиб (ингибитор активности протеасомы 26S), которая в комбинации с бевацизумабом для подавления роста сосудов приводит к ингибированию опухолевого роста и улучшению выживаемости пациентов с глиобластомами (Bota, 2013); препараты в виде антисмысловых нуклеотидов, которые связываются с мРНК целевого опухолевого белка и ингибируют трансляцию и подавляют его синтез – облимержен, препятствующий продукции антиапоптотического белкового фактора Bcl-2 (Galatin, 2011); препараты на основе натуральных природных соединений – неовастат, содержащий экстракт хряща акулы, используется в качестве антиангиогенного препарата в терапии опухолей различного генеза, ингибируя активность VEGF, индуцируя апоптоз сосудистых клеток в опухоли

и подавляя активность матриксных металлопротеиназ (ММП-2), препятствуя метастазированию (Gingras, 2001).

Отдельную ветвь таргетной терапии занимает терапия живыми клетками, клеточными компонентами (иммунотерапия) и онколитическими вирусами (виротерапия). Примером иммунотерапии является персонализированная адоптивная терапия (СART-клеточная терапия), суть которой заключается в подготовке индивидуального препарата из клеток, полученных от самого пациента. Перепрограммирование иммунных Т-лимфоцитов пациента с помощью клеточных вакцин на распознавание и уничтожение опухолевых клеток позволяет эффективно бороться с острым лимфобластным лейкозом у детей (препарат тисагенлеклейсел) (Maude, 2018) и крупноклеточной В-клеточной лимфомой у взрослых (препарат аксикабтаген силолейсел) (Roberts, 2017). Антигенные вакцины имеют в своем составе фрагменты белков опухолевых клеток, которые непосредственно вводятся пациенту или доставляются на поверхности дендритных или других антиген-презентирующих клетках, или геном-содержащие элементы, кодирующие белки, которые могут быть транспортированы с помощью рекомбинантных вирусов (Tagliamonte, 2014). Терапия антигенной вакциной HSPPC-96 на основе белка теплового шока, выделенного из опухолевых клеток глиобластомы после ее резекции у онкологических больных, способствовала увеличению выживаемости у пациентов, не смотря на серьезные побочные эффекты (Sampson, 2014).

Другой вариант иммунотерапии заключается в применении цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) и интерферонов (ИФН), стимулирующих иммунную систему на уничтожение опухоли. ИФН α формирует иммунный ответ за счет активации лимфоцитов, натуральных киллеров и дендритных клеток. На этом принципе строится использование высоких доз рекомбинантного ИФН α -2b для лечения меланомы (Moreno Nogueira, 2013). Рекомбинантный ИЛ-2 активирует пролиферацию Т-лимфоцитов и натуральных киллеров, стимулирует дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов и активацию макрофагов, сдвигает Th1/Th2-баланс в сторону преобладания Th1-клеточного звена иммунитета. Наибольший исследуемый эффект применения препаратов на основе рекомбинантного ИЛ-2 был получен при лечении меланомы и почечноклеточного рака (Rosalia, 2014). Несмотря на проблему с появлением токсичности при высокодозном лечении, в ходе клинических испытаний удалось подобрать эффективную дозу и в комбинации с адоптивной иммунотерапией и химиотерапией достичь ремиссии первичных опухолей и сокращения метастазирования, стабилизировать течение болезни и продлить выживаемость пациентов (Hughes, 2015).

Отдельное внимание в терапии опухолей уделено использованию ростовых факторов (ГМ-КСФ и Г-КСФ), которые стимулируют пролиферацию клеток-предшественников и регулируют свойства зрелых клеток миелоидного ряда и активируют гранулоциты, макрофаги. Генная

инженерия на сегодняшний день позволяет проводить разные манипуляции с геномами. Вставка фрагмента гена ГМ-КСФ в клетку меланомы линии 526-mel методом электропорации позволило получить рекомбинантную клеточную вакцину GVAX для терапии рецидивирующей меланомы с увеличением числа активированных моноцитов и повышением их иммунологической реактивности (Lipson, 2015).

За последние годы иммунотерапия признана более прогрессивным методом лечения в сравнении с традиционной химиотерапией (Brahmer, 2017; Jiang, 2014), вследствие чего появляется всё больше новых генно-инженерных модифицированных разработок, целью которых является комбинирование применения иммунотерапии с другими методами лечения и усиление цитокиновой терапии. Научная группа института молекулярной иммунологии г. Гуанчжоу сконструировала слитый белок, состоящий из двух широко применяемых в онкологии цитокинов – ИЛ2-ГМКСФ, который повышает противоопухолевый иммунный ответ, и показала, что подкожное введение белка препятствует развитию опухолевого процесса на вивальной модели при лечении мышинной меланомы B16F10 эффективнее, чем терапия каждым компонентом по отдельности (Wen, 2016).

С помощью методов генной инженерии можно не только доставлять в опухолевую ткань гены и белки, направленные на активацию клеточной гибели и иммуномодуляцию, но и напрямую редактировать геном опухолевой клетки. Разработанная на основе иммунной системы бактерий технология CRISPR/Cas, которую используют в качестве инструмента для редактирования генома, позволяет встроить нужную ДНК путем гомологичной рекомбинации и изменить «плохой» ген опухолевой клетки на «хороший» или вырезать вовсе часть гена (Chen, 2016). Первыми технологию CRISPR/Cas применили на человеке в 2016 ученые Сычуанского университета, вырезав у Т-лимфоцитов крови пациента с НМРЛ ген, кодирующий белок PD-1, и вернув клетки в организм больного с целью повышения иммунного и клинического ответа пациента (Cyranoski, 2016). Технология CRISPR/Cas в 2017 году была опробована для ингибирования экспрессии ассоциированной с уротелиальной карциномой lncРНК (UCA1), которая стимулирует пролиферацию клеток рака мочевого пузыря (Zhen, 2017) и подавления гена PLK1 (поло-киназа-1), активация которой способствует метастазированию раковых клеток простаты (Zhen, 2017a).

Другим более изученным способом доставки генов в опухолевую клетку в генной инженерии являются вирусные векторы на основе адено-, ретро-, герпес- и других вирусов (Nayerossadat, 2012). Создание вирусных векторов предполагает модифицирование вируса с целью устранения патогенности для организма, способности автономно реплицироваться в клетках и проявлять цитотоксические свойства. Однако кроме роли транспортеров генов в генной терапии вирусы сами по себе могут выступать противоопухолевыми агентами, разрушая опухоли

напрямую или опосредованно через активацию иммунной системы, причем действуя избирательно на опухолевые клетки без токсического воздействия на нормальные здоровые клетки организма.

1.4. Достижения виротерапии в лечении злокачественных заболеваний

подавляющее большинство злокачественных опухолей научилось уходить от иммунного надзора со стороны организма и избегать клеточных систем защиты, связанных с торможением неконтролируемого роста клеток и запрограммированной клеточной гибелью (Hanahan, 2011; Takeuchi, 2009). Одновременно с этим, нарушенная работа сигнальных путей делает опухолевые клетки намного чувствительнее к инфицированию онколитическими вирусами, которые эффективно используют неконтролируемое деление и мобилизованный синтетический аппарат раковых клеток для создания вирусного потомства. Онколитические вирусы представляют класс противоопухолевых терапевтических агентов, которые способны избирательно инфицировать и уничтожать клетки злокачественных опухолей без повреждения клеток нормальных здоровых тканей. Такие вирусы применяют в онколитической виротерапии (Chiocca, 2014). Активная вируспродукция может приводить к гибели инфицированной клетки путем прямого разрушения клеточной оболочки и внутриклеточных оргanelл при высвобождении новых вирионов и активации механизмов клеточной гибели. Кроме того, вирус-индуцированные воздействия могут включать разрушение кровеносных сосудов в опухоли, что изменяет трофику опухолевой ткани.

Первоначально заявления о потенциальной способности вирусов влиять на прогрессию опухолей основывались на наблюдениях за онкобольными, которые претерпевали ремиссии опухолей после инфекционных заболеваний. Первый описанный случай зафиксирован более ста лет назад и связан с ремиссией миелолекоза у 42-летней пациентки после заражения вирусом гриппа (Atherton, 2013). Другой случай, датированный началом XX века, описывает спонтанную ремиссию опухоли рака шейки матки после введения инъекции живой вакцины против бешенства (Mullen, 2002). В последующие годы регистрировались клинические случаи регрессии опухолей у онкобольных после перенесения кори и гепатита (Hoster, 1949; Zygiert, 1971).

На сегодняшний день в разработках в качестве онколитических агентов предложен широкий спектр природных и генетически модифицированных вирусов, терапевтическая активность которых не ограничивается только прямым вирусным онколизисом опухолевых клеток. Для ряда вирусов описана способность опосредованно воздействовать на опухолевую ткань путем активации иммунного ответа организма (Galluzzi, 2014).

Возможности новых экспериментальных методов онкотерапии и достижения в области генной инженерии активно внедряются в виротерапию. С целью усиления эффективности вирусного противоопухолевого потенциала многие природные вирусы претерпевают генетические изменения, направленные на повышение иммуногенности, ослабление патогенности

используемых штаммов для обеспечения безопасности пациентов и увеличение тропизма к опухолевым клеткам.

На сегодняшний день три препарата на основе вирусов одобрены для использования в клинике – Gendicine, Oncorine и Imlygic. Препарат Gendicine на основе дефектного по репликации аденовирусного вектора с делецией E1 первым был одобрен в клинике для лечения опухолей головы и шеи в 2003 Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Китая (Chinese Food and Drug Administration, CFDA) (Li, 2015). Модификация аденовирусного генома направлена в первую очередь на получение безопасной векторной системы путем предотвращения экспрессии аденовирусных генов и интеграции в геном человека и на перенос эффекторного гена p53, ответственного за арест клеточного цикла и индукцию апоптотических процессов в ответ на активацию онкогенов. Несмотря на хорошую переносимость с незначительными проявлениями нежелательных побочных эффектов, дефектные по репликации векторы обладают низкой трансфекцией, поэтому на территории Китая был разработан второй препарат - Oncorine™, представляющий собой рекомбинантный условнореплицирующий аденовирус, в геном которого встроены промоторы опухоль-ассоциированных генов для усиления репликации в опухолевых клетках (Yu, 2007). Противоопухолевые свойства препарата тестировали в основном сочетанно с химио- и лучевой терапией, так как в монотерапии его эффективность невысока. В связи с этим в 2005 году CFDA одобрило H101 в качестве лекарственного препарата Oncorine™ для онколитической виротерапии в сочетании с цитостатиками для опухолей головы и шеи (Garber, 2006; Lu, 2004).

Третий препарат с коммерческим названием Imlygic компании BioVex Inc (Amgen) одобрен Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (Food and Drug Administration, FDA) в США в октябре 2015 года (Berkrot, 2015) и Европейским агентством лекарственных средств (European Medicines Agency, EMA) в январе 2016 года (Semedo, 2016). Imlygic (talimogene laherparepvec, T-Vec, OncoVEX^{GM-CSF}) разработан на основе модифицированного вируса простого герпеса 1 типа с выраженной прямой онколитической активностью и предназначен для лечения метастатической меланомы (IMLYGIC, 2018; Johnson, 2015). Вирус селективно реплицируется в опухоли, вызывает вирусный лизис клеток и, в дополнение, продуцирует ГМ-КСФ для усиления системного противоопухолевого иммунного ответа.

Помимо коммерческих препаратов на основе аденовирусов и вируса простого герпеса успех виротерапии как метода лечения отражен в количестве имеющихся разработок на стадиях завершенных и активных клинических испытаний, результаты которых демонстрируют безопасность для пациентов, значительную регрессию опухолей различной этиологии и сохранение долгосрочного эффекта после лечения (Pol, 2015). В настоящее время доклинические

исследования и фазы клинических испытаний проходят разработки на основе онколитических штаммов вируса везикулярного стоматита, вируса осповакцины, коксакивируса, вируса полиомиелита, вируса кори, вируса болезни Ньюкасла, реовируса и других.

На территории России исследования противоопухолевых свойств вирусов были начаты д.м.н. Ворошиловой М.К. при Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР в 60-х годах XX века. После введения пациентам энтеровирусных вакцин вирус был обнаружен преимущественно в опухолях при обследовании тканей пациентов. Последующие исследования позволили выявить репликацию непатогенного вируса в опухолевой клеточной культуре с последующей клеточной гибелью и активацию Т-лимфоцитов и стимуляцию продукции интерферона (Чумаков, 2012). Однако исследования были приостановлены из-за недостатка знаний о механизмах опухолевого процесса и вирусного онколизиса. Интерес к виротерапии в России вернулся с работами д.м.н. Кешелавы В.В. по изучению онколитических свойств вакцинного штамма вируса болезни Ньюкасла. В ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России проводились клинические испытания аутологичных инактивированных вакцин и инъекций живого штамма LaSota птичьего вируса болезни Ньюкасла на пациентах с меланомой, раком молочной железы, толстой кишки и яичников. По результатам исследований была показана хорошая переносимость вакцинотерапии, и сделан вывод о способности аутологических вакцин ВБН инициировать выраженный специфический противоопухолевый эффект на основе высокого процента полного и частичного ответа на терапию (Кешелава, 2007). Неoadьювантная терапия РМЖ при внутрикожном введении живой вакцины в комплексе с химиотерапией и резекцией опухоли позволила повысить эффективность лечения, улучшить качество жизни за счет создания условия для выполнения органосохраняющей операции и достичь 97,8% трехлетней безрецидивной выживаемости (Кешелава, 2009; Кешелава, 2010).

Помимо исследования птичьего вируса болезни Ньюкасла как онколитического агента проводились поисковые исследования других вирусов - разработка вариантов рекомбинантного дефектного по репликации вируса осповакцины с вставками ГМ-КСФ для усиления активации иммунной системы в ответ на опухолевые антигены и TRAIL для активации апоптоза (Максютов, 2013), оценка терапевтического эффекта рекомбинантного вектора вируса гриппа на глиальных опухолях *in vitro* и при интратуморальном введении на экспериментальной модели глиомы у крыс (Шурыгина, 2016), оценка онколитической активности рекомбинантного аденовируса 2-го серотипа (Ad2del) с делецией гена E1B-55K *in vitro*, который показал способность селективной репликации на культурах p53-дефектных опухолевых клеток человека (Святченко, 2003), изучение действия штамма вируса осповакцины, продуцирующего индуцирующий апоптоз белок апоптин на модели мышинной опухоли (Зонов, 2016).

Из всех российских разработок в области виротерапевтических исследований только рекомбинантный аденовирус человека Ade12 5-го серотипа, дефектный по гену E1B, дошел до стадии клинических испытаний в виде препарата «Канцеролизин», полученного на базе ГНЦ ВБ «Вектор» (Вдовиченко, 2012; Нетесов, 2011). По результатам I фазы испытаний были получены данные об отсутствии у лечебного препарат «Канцеролизин» пирогенных свойств, токсичности (острой и хронической) и влияния на центральную нервную и иммунную систему и описана избирательная инфекционная активность в отношении p53-дефектных опухолевых клеток человека *in vitro* и ингибирование опухолевой прогрессии при интратуморальном введении на модели иммунодефицитных мышей с привитыми опухолями человека.

Мировая исследовательская практика онколитической виротерапии намного богаче и разнообразнее. На февраль 2018 года на сервере Национальных институтов здравоохранения США (NIH) зарегистрировано 22 проводимых анонсированных клинических испытаний с использованием виротерапевтических препаратов (NIH, 2018). К числу наиболее известных разработок относится Reolysin® - препарат на основе человеческого реовируса 3 серотипа (штамм Dearing) – клинические испытания которого проходят в США, Канаде и Великобритании (Oncolytics, 2018). По результатам 22 клинических испытаний препарат продемонстрировал отсутствие побочных действий для онкобольных и способность воздействовать на опухоли головного мозга, рак головы и шеи, меланому, рак легкого, молочной железы, яичников, остеосаркому и опухоли, которые не реагировали на обычную стандартную терапию. Препарат тестировали при монотерапии (Galanis, 2012), а также в сочетании с лучевой терапией (Harrington, 2010) и применением химиотерапевтических препаратов (Comins, 2010). Виротерапия с Reolysin® приводила к торможению развития опухоли и метастазирования (Galanis, 2012) и способствовала регрессии опухоли и увеличению продолжительности жизни пациентов (Oncolytics, 2018). Был показан иммуноопосредованный ответ опухоли в результате виротерапии. В настоящее время идут еще 4 клинических испытаний в США и Канаде, цель которых заключается в проверке эффективности комбинации Reolysin® с химиопрепаратами и выявлении прогностических маркеров для виротерапии Reolysin® (Oncolytics, 2018).

Другой препарат на основе человеческого вируса Коксаки – Cavatak™ (Viralytics, 2018) в США и Великобритании проходит проверку в 1 и 2 фазах клинических испытаний на безопасность и переносимость дозприинтратуморальном и внутривенном введении больным с меланомой, немелкоклеточным раком легкого, раком простаты и раком мочевого пузыря. Также проводят испытания по оценке противоопухолевого и иммуноопосредованного ответа комбинированной терапии в сочетании с химиотерапевтическими препаратами пембролизумабом (Keytruda™) и ипилимумабом (Yervoy®) для лечения меланомы (Viralytics, 2018). Вторая фаза

клинических исследований на пациентах с поздней стадией меланомы уже продемонстрировала хорошую выживаемость онкобольных (75,4%) в течение года (Andtbacka, 2015).

Биотехнологическая компания Сан-Диего Tосagen Inc. (Сан-Диего, США) разрабатывают и проводят исследования препарата Тоса 511 &ТосаFC для лечения глиом высокой степени злокачественности (Tосagen Inc, 2018) на основе ретровирусного вектора (Тоса 511) в сочетании с противогрибковым средством ТосаFC, содержащий 5-FC (Flucytosine). Тоса 511 селективно попадает в опухолевые клетки – повышает уровень цитозиндеаминазы, которая способна катализировать превращение 5-FC в противораковый агент 5-фторурацил (Ostertag, 2012). Данный препарат уже показал селективность для опухолевых клеток, отсутствие токсичности для здоровых тканей, активацию противовирусного иммунного ответа. На официальном сайте компании Tосagen Inc. описаны результаты доклинических испытаний на иммунокомпетентных и иммунодефицитных животных – активация Т-клеточного ответа, динамика регрессии опухоли у животных, 100%-ая выживаемость животных после виротерапии (Huang, 2015; Ostertag, 2012). Показана низкая токсичность комбинированной терапии Тоса 511 сТосаFC и увеличение продолжительности жизни пациентов (Tосagen Inc, 2018a). На сегодняшний день TосagenInc. запущено клиническое испытание в 2/3 фазы, цель которого оценить и сравнить эффективность препарата со стандартным лечением ломустинном и темозоломидом или бевацизумабом (Tосagen Inc, 2018b).

Компания DNatrix therapeutics (США) работает над рекомбинантным аденовирусом Delta24-RGD (DNX-2401) с делецией 24 bp в гене E1, которая ограничивает репликацию в клетках с дефектным pRb-сигнальным путем, и вставкой RGD для повышения тропизма вируса к опухолевым клеткам за счет связывания с альфа v-интегринами на поверхности опухолевых клеток. Вирус применяется для онкотерапии рецидивирующих глиом. В фазе I клинических испытаниях вирус вводился итратуморально длительными микроинфузиями через катетеры в разной концентрации от 10^7 до 10^{10} (DNatrix Inc, 2018). По результатам испытаний введение препарата не оказало токсического действия и привело к регрессии опухоли и полному ответу на виротерапию у 3 из 25 человек. У пациентов наблюдали активацию цитокинов, а именно повышение в десятки раз уровня провоспалительного интерлейкина IL-12p70 (Lang, 2014), который усиливает пролиферацию и цитолитическую активность НК-клеток и Т-хелперов, что стимулирует клеточный иммунитет против опухолевых клеток. Компания DNatrix therapeutics на сегодняшний день проводит I фазу испытаний комбинированной терапии с тимозоломидом для терапии мультиформнойглиобластомы (DNatrix Inc, 2018b) и запускает клинические испытания по оценке противоопухолевого потенциала однократной интратуморальной инъекции DNX-2401 на глиосаркоме и глиобластоме (DNatrix Inc, 2018a).

Биофармацевтическая компания США JennerexBio therapeutics, Inc (SillaJen) работает над лекарственным препаратом Pexa-Vec (Jx-594) на основе рекомбинантного вируса осповакцины, в который вставлен ген GM-CSF для усиления иммуномодулирующего действия и удален ген тимидинкиназы для селективной репликации вируса в опухолевых клетках (Breitbach, 2015). Клинические испытания на пациентах с гепатоцеллюлярной карциномой после интратуморальных инъекций показали наличие побочных эффектов от введения вируса в виде гриппоподобных симптомов, регрессию опухоли печени и дозозависимое пролонгирование времени жизни (Нео, 2012) и хорошую переносимость внутривенных инъекций вируса со схожими временными симптомами (озноб, головная боль, тошнота) с торможением развития и стабилизацией опухолевого развития (Park, 2015). Также показана способность вируса осповакцины инфицировать клетки эндотелия сосудов и вызывать острые сосудистые нарушения в опухоли, что ведет к уменьшению перфузии гиперваскуляризированной опухолевой ткани печени, нарушению трофики и некрозу (Breitbach, 2013). Помимо этого интратуморальные инъекции Pexa-Vec перед применением стандартного лечения сорафенибом привели к остановке опухолевой прогрессии, что свидетельствует об эффективности комбинированной терапии по сравнению с монотерапией химиопрепаратом (Нео, 2011).

1.5. Вирус болезни Ньюкасла как перспективный кандидат на роль противоопухолевого агента и обоснование его применения в концепции онколитической виротерапии

Биология вируса болезни Ньюкасла

Вирус болезни Ньюкасла (ВБН) принадлежит к семейству *Paramyxoviridae* рода *Avulavirus* (Мауо, 2002). Вирус вызывает высоко контагиозное заболевание птиц и остается одной из самых значимых инфекций в мире среди домашней птицы, несущей серьезное экономическое и экологическое значение. Первая вспышка болезни Ньюкасла была описана в 1926 году на острове Ява, хотя вполне вероятно, что она встречалась и ранее (Macpherson, 1956). Болезнь получила свое название по географическому месту ее первой вспышки в Европе в 1926 году в городе Ньюкасл-апон-Тайн, когда ВБН был описан как возбудитель (Alexander, 2004).

ВБН был выделен от представителей более 240 видов среди 27 отрядов птиц (Alexander, 2008). Природными резервуарами для ВБН являются водоплавающие птицы, которые мигрируют на длительные расстояния, что способствует распространению вируса среди дикой птицы между отдельными регионами, лежащими на пути миграционных пролетных маршрутов. Вместе с тем существует потенциальная возможность передачи вируса от дикой птицы к домашней. Среди домашней птицы наиболее чувствительны к инфекции ВБН являются куры, особенно цыплята, индейки, голуби, перепелы и попугаевы птицы (FAD PRoP, 2013). В настоящее время во многих

регионах заболевание относится к контролируемым инфекциям в промышленных птицеводческих хозяйствах за счет проведения вакцинаций. В частных хозяйствах, зачастую, птиц не вакцинируют.

Симптомы БН и течение заболевания у птиц зависит от патотипа штамма вируса, а также вида птицы, ее возраста, статуса иммунной системы, условий окружающей среды и влияния других патогенов. Проявление БН может варьироваться от легкой формы инфекции до тяжелой с высокой смертностью поголовья птицы. На основании теста на определение индекса интрацеребральной патогенности на суточных цыплятах штаммы подразделяют на три основных патотипа: лентогенный (бессимптомное или легкое заболевание; штаммы считаются авирулентными), мезогенный (штаммы могут вызывать респираторные осложнения с невысоким числом смертельных случаев заболевшей птицы) и везогенный (высоковирулентные висцеротропные, вызывающие серьезные геморрагические поражения пищеварительной системы, или нейротропные, приводящие к нарушениям нервной и дыхательной систем; до 100% смертности зараженных цыплят) (OIE, 2012). ВБН распространяется в основном через прямой контакт между инфицированной и здоровой птицей алиментарным или аэрогенным способом. Профилактическая вакцинация на птицеводческих предприятиях в настоящее время применяется в больших масштабах, благодаря чему удается предотвратить вспышки БН и распространение ВБН (Grimes, 2002; The council of the European communities, 1992). Несмотря на программы вакцинации и рекомендованные меры безопасности при транспортировке птиц и птицеводческой продукции (OIE, 2017), вспышки по-прежнему происходят регулярно, а в некоторых странах, где отсутствуют ресурсы для адекватной профилактики и контроля заболеваний, БН считается эндемичной (OIE, 2014).

Голубиный парамиксовирус серотипа 1 (PPMV-1)

Возбудитель БН среди голубей носит название голубиный парамиксовирус серотипа 1 (PPMV-1) и является антигенным вариантом птичьего парамиксовируса серотипа 1 (APMV-1) (Alexander, 2011). Впервые голубиный вариант ВБН был изолирован в 1978 году на территории Средней Азии. PPMV-1 быстро распространился по всему миру и уже к 1981-1982 годам PPMV-1 вызвал вспышки заболевания в Европе (Pestka, 2014). С того времени вспышки заболевания периодически регистрируются среди диких и домашних голубей на территории Европы Северной Америки (Alexander, 2011; Kim, 2008; Schuler, 2012).

Большинство голубиных штаммов принадлежат генотипу VIb ВБН. Многоосновный сайт расщепления белка слияния PPMV-1, как главная детерминанта патогенности и вирулентности, относит голубиные изоляты к везогенной и мезогенной группам, однако голубиные штаммы могут не вызывать болезнь у цыплят, при этом быть патогенными для голубей. Также известны случаи

повышения вирулентности изначально непатогенных для цыплят голубиных штаммов путем пассирования вируса (Dortmans, 2011; Heiden, 2014).

Сообщалось об уникальном случае выделения вируса ВБН у пациента, умершего от тяжелой формы пневмонии (Goebel, 2007). Анализ нуклеотидной последовательности изолированного штамма показал высокую гомологию со штаммами вирусов, ранее полученных от голубей в Европе и Северной Америке.

Строение вируса болезни Ньюкасла.

Вирионы ВБН имеют сферическую или эллипсоидную форму диаметром 100 – 350 нм (Battisti, 2012). Снаружи вирион покрыт двухслойной липидной оболочкой клеточного происхождения, которая несет вирусные белки - белок слияния (F) и гемагглютинин-нейраминидазу (HN). Поверхностные вирусные гликопротеины HN и F необходимы для осуществления процесса слияния вирусной и клеточной мембран и в комплексе друг с другом отвечают за проникновение вируса в клетку (Ganar, 2014). HN-белок способствует ферментативному отщеплению сиаловой кислоты с поверхности инфицированных клеток и вириона для предотвращения самоагрегации вируса.

Изнутри липидную оболочку выстилает слой матричного белка (M), который считается главным белком, регулирующим сборку вириона в клетке и поддерживающим структуру вирусной частицы (Battisti, 2012). Известно, что на ранних этапах инфицирования M белок локализуется преимущественно в ядре, в отличие от других вирусных белков, которые располагаются в цитоплазме клетки (Harrison, 2010).

Под слоем M-белка расположен нуклеокапсид, образованный геномной РНК вируса, защищенной от нуклеазной активности, и нуклеопротеином (NP), который связан с фосфопротеином (P) и большим полимеразным белком (L). Вместе белки P и L составляют транскрипционно-репликативный полимеразный комплекс, необходимый вирусу для репликации в инфицированной клетке (Harrison, 2010).

Геном вируса болезни Ньюкасла представлен одноцепочечной несегментированной негативной вирусной РНК длиной 15,186, 15,192 или 15,198 нуклеотидов, состоящей из шести генов (Paldurai, 2014). Гены кодируют шесть структурных белков – нуклеокапсидный белок (NP), фосфопротеин (P), матричный белок (M), белок слияния (F), гемагглютинин-нейраминидазный комплекс (HN) и большой полимеразный белок (L).

В начале и конце каждого гена есть консервативные «start» и «end» последовательности, которые контролируют процесс транскрипции, являясь транскрипционными промоторами и терминаторами. Между собой гены разделены межгенными участками длиной от 1 до 47 нуклеотидов (Munir, 2012). На 3'-конце находится лидерная нетранслируемая последовательность,

состоящая из 55 нуклеотидов, а на 5'-конце расположена трейлерная нетранслируемая последовательность из 114 нуклеотидов (Ganar, 2014).

В результате РНК-редактирования при инициации транскрипции Р-гена образуются два дополнительных неструктурных белка V и W путем добавления G остатков – при добавлении одного остатка получается V-белок, в случае добавления двух остатков – W-белок. Представленные пропорции мРНК Р/V/W белков в ВБН-инфицированных клетках составляет 68%, 29% и 2%, соответственно (Mebatsion, 2001).

Исследования показывают, что вирулентность ВБН определяет аминокислотная последовательность сайта расщепления поверхностного белка слияния (F) клеточными протеазами (Dortmans, 2011a). Наличие одной основной аминокислоты в сайте расщепления лентогенных штаммов ограничивает возможность расщепления белка только специфическими внеклеточными трипсиноподобными протеазами, делая такие штаммы низко вирулентными для организма. В то же время наличие нескольких основных аминокислот в сайте расщепления белка и фенилаланина в позиции 117 легко позволяет расщепить F0-протеин внутриклеточными протеазами, что обуславливает высокую вирулентность и патогенность штаммов для птиц.

Белок слияния F считается главной, но не единственной детерминантой вирулентности и патогенности штаммов ВБН. В серии работ было показано, что неструктурный V белок является дополнительным фактором, влияющим на вирулентность штамма, способный блокировать противовирусное действие IFN- α путем деградации активатора транскрипции гена IFN- α и - β фосфорилированного белка STAT1 (Huang, 2003; Qiu, 2016). Отмечается также видоспецифическая активность V белка не только в процессе избегания клеточной ИНФ-защиты, но и в предотвращении апоптоза ВБН-инфицированных клеток (Park, 2003). Вторым поверхностный вирусный гликопротеин HN совместно с F белком определяет тропизм и вирулентность вируса, а точнее взаимодействие эктодоменов этих поверхностных белков (Kim, 2011). Кроме того HN-белок является главной антигенной детерминантой вируса.

Репликация вируса болезни Ньюкасла.

Взаимодействие вируса с клеткой начинается со связывания вирусного гликопротеина HN с поверхностными клеточными рецепторами, несущими остатки сиаловой кислоты. Высокая аффинность данного взаимодействия и повышенный уровень сиалирования клеточных мембран злокачественных клеток создают условия для предпочтительного связывания вируса с опухолевыми, а не с нормальными клетками. После начальной ассоциации происходит слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны опосредованное действием F-белка вируса. Вирусная оболочка разрушается и через образовавшиеся поры в клеточной мембране вирусный нуклеокапсид попадает в цитоплазму клетки.

В цитоплазме клетки идет процесс транскрипции вирусного генома, представленного одноцепочечной нефрагментированной негативной РНК. Сначала синтезируется мРНК, с которой затем транслируются все вирусные белки. Геном ВВН представляет собой одну транскрипционную единицу с единственным промотором на 3'-конце. Вдоль генома есть своеобразный градиент эффективности транскрипции, то есть ген самого обильного белка NP считывается часто на 3'-конце, а ген белка L, содержание в вирионе которого очень мало, транскрибируется реже. Между собой гены разделены межгенными участками длиной от 1 до 47 нуклеотидов, которые не транскрибируются.

Процесс репликации начинается после трансляции и накопления вирусных белков, преимущественно NP белка, который является главным индуктором переключения РНК-зависимой РНК полимеразы от транскрипции к процессу репликации. Репликация протекает в цитоплазме клетки в два этапа – сначала синтезируется комплементарная геному полноразмерная копия, называемая (+) антигеномом, которая затем становится матрицей для синтеза копий (-) геномной РНК. Синтез антигенома осуществляется в зараженной клетке на матрице геномной РНК при помощи транскриптазного комплекса РНК-полимеразы, который находится в составе вируса и попадает вместе с ним в инфицированную клетку (Yusoff, 2001). Одновременно с синтезом геномной РНК происходит ее инкапсидация при наличии белков NP.

Сборка вирионов ВВН идет в цитоплазме в два этапа - начинается с присоединения белка NP к геномной РНК с образованием плотного спирального нуклеокапсида, затем к структуре присоединяются P и L белки, формируя транскриптазный комплекс.

Вирусные гликопротеины HN₀ и F₀ синтезируются на шероховатом ЭПР, в то время как остальные структурные (NP, P, L и M) и не структурные (V и W) белки вируса образуются в цитоплазме. Прежде, чем транспортироваться к поверхности клетки, гликопротеины претерпевают несколько посттранскрипционных модификаций, таких как гликозилирование и образование дисульфидных связей, во время прохождения по эндоплазматическому ретикулуму (ЭПР) и аппарату Гольджи. В аппарате Гольджи происходит расщепление F-белка, что обуславливает протеолитическую активацию белка слияния. Далее белки транспортируются к клеточной поверхности, где будет собираться оболочка вирионов.

Важную роль в сборке вирусных частиц играет M-белок. Он поддерживает структуру вирионов и вместе с поверхностными гликопротеинами участвует в высвобождении нового потомства из клеток, связывая цитоплазматические участки гликопротеинов с нуклеокапсидами.

Для предотвращения самоагрегации вирусных частиц и прикрепления к клетке белок HN удаляет остатки сиаловой кислоты с гликопротеинов.

ВБН в концепции вирусной терапии рака

Онколитические вирусы как агенты для противоопухолевой терапии предлагают несколько важных преимуществ по сравнению с традиционными подходами лечения онкологических заболеваний и другими таргетными методами терапии:

(1) опухоль-селективное инфицирование и размножение вируса в клетке, приводящее к гибели, без цитотоксического воздействия на здоровые клетки организма, что повышает терапевтический индекс вирусного препарата;

(2) вовлечение инфицированных опухолевых клеток в цитолитическую гибель за счет прямого лизиса мембран при высвобождении вирусного потомства помимо активации механизмов клеточной гибели; при этом гибель клеток может происходить независимо от статуса белков, необходимых для активации запрограммированных механизмов смерти;

(3) воспроизведение вируса за счет репликации в раковых клетках, обеспечивающее распространение инфекционных частиц в опухолевой ткани после высвобождения вирусного потомства, что увеличивает количество активного агента и число инфицированных клеток и, как следствие, повышает терапевтический эффект;

(4) гибель опухолевых клеток (путем прямого онколизиса или же программируемой клеточной гибелью) усиливает провоспалительное микроокружение опухоли и привлечение клеток иммунной системы.

При наличии всех перечисленных широких терапевтических возможностей вирусная онкотерапия имеет большой потенциал для лечения рака, однако для успешного применения виротерапии, вирусы должны соответствовать строгим критериям безопасности и эффективности.

В вопросе биобезопасности онколитический вирусный агент должен быть апатогенным для человека, иметь строгую тропность к инфицированию и уничтожению опухолевых клеток без повреждения здоровых, не должен передаваться от пациента к здоровому человеку, не вызывать тяжелых нежелательных побочных эффектов и не элиминироваться иммунной системой пациента за счет уже имеющихся в крови антител к применяемому вирусному агенту.

Апатогенность

После наблюдений за наступлением ремиссии опухолей у пациентов, перенесших инфекционные заболевания (Atherton, 2013; Mullen, 2002), и в отсутствии эффективных методов лечения для терапии рака стали применять патогенные для человека вирусы, несмотря на высокий риск развития потенциально опасной для жизни инфекции. Ряд исследований продемонстрировал успех виротерапии патогенными вирусами в виде ремиссии опухолей, однако, были зарегистрированы тяжелые осложнения, связанные с инфекционным процессом, вплоть до смерти пациентов (Kelly, 2007). Благодаря современным методам многие естественно патогенные для

человека онколитические вирусы (такие как аденовирус и вирус простого герпеса) используют для получения безопасных вирусных векторов, проводя генно-модифицированную подготовку вируса путем удаления отвечающих за вирулентность генов, вирусную репликацию ставят под контроль «новых» промоторов или одну часть генома заменяют генами других вирусов. Хотя все полученные конструкции проходят проверку на безопасность на моделях *in vitro* и *in vivo*, и риск серьезного заболевания после естественной аденовирусной инфекции встречается редко, генная терапия аденовирусным векторам 5-го серотипа привела к серьезным побочным эффектам после внутривенного введения в виде синдрома системного воспалительного ответа, ДВС-синдрома и полиорганной недостаточности и повлекла смерть пациента (Raper, 2003). Использование в виротерапии вирусов животных, не патогенных по своей природе для человека, позволяет значительно снизить риски появления инфекционных заболеваний. Вирус болезни Ньюкасла, будучи вирусом птиц, может попасть в организм человека от зараженной птицы или при использовании аэрозольных вирусных вакцин против ВБН, как правило, путем контакта вирусных частиц со слизистыми оболочками. Как правило, заражению могут быть подвержены работники птицеводческих предприятий и сотрудники лабораторий. Инфекция у человека протекает бессимптомно и не представляет угрозы для здоровья. Однако описаны случаи проявления гриппоподобных симптомов, ларингита, легкой формы лихорадки, легкой формы конъюнктивита (Evans, 1955; Nelson, 1952; Shimkin, 1946). О передачи вируса от человека к человеку никогда не сообщалось, также как и о возможности инфицирования ВБН посредством потребления мяса птицы.

Опухолеспецифическая тропность онколитических вирусов

Большинство исследований проводится с использованием рекомбинантных вирусов, которые выполняют роль векторной системы для транспорта нужных генов в опухоль и иммуномодуляторов при онкологических заболеваниях. За основу часто берутся патогенные для человека штаммы вирусов, поэтому становится необходимым применять методы генной инженерии не только для усиления противоопухолевой активности и вставки дополнительных генов, но и для снижения патогенности и токсичности вируса для организма и формирования опухолевой избирательности с последующим уничтожением раковых клеток.

В свою очередь вирусы дикого типа демонстрируют природную селективность при репликации в опухолевых клетках без каких-либо генетических манипуляций. Несмотря на то, что механизм, лежащий в основе избирательности вирусов дикого типа в отношении раковых клеток, останется темой интенсивного обсуждения, известно, что для вируса опухолевые клетки являются предпочтительным субстратом для репликации, так как они активно делятся и имеют мобилизованный синтетический аппарат, необходимый для размножения вируса. Опухолевое

микроокружение и строение опухолевой ткани, характеризующееся изменением межклеточных контактов, облегчают адсорбцию вирусных частиц. ВБН не нуждается в дополнительных разработках стратегий эффективной доставки вирусов, проявляя природный опухолевый тропизм, и преодоления противовирусного иммунного ответа хозяина, так как относится к вирусу птиц. Попадая в опухолевую клетку, онколитический вирус берет под контроль синтетический клеточный аппарат и воспроизводит множество вирусных белков для сборки новых вирионов за счет клеточных ресурсов. Затем, вирус завершает свой репликативный цикл, что приводит к высвобождению инфекционных частиц вируса. Очевидно, что для успешного выхода из клетки вирусных частиц требуется лизис мембраны и высвобождение содержимого клетки. Поэтому природные онколитические вирусы без модификаций генома могут уничтожать опухолевые клетки путем разрушения мембран, не полагаясь на программированные клеточные пути смерти (Guo, 2014) (Рисунок 3).

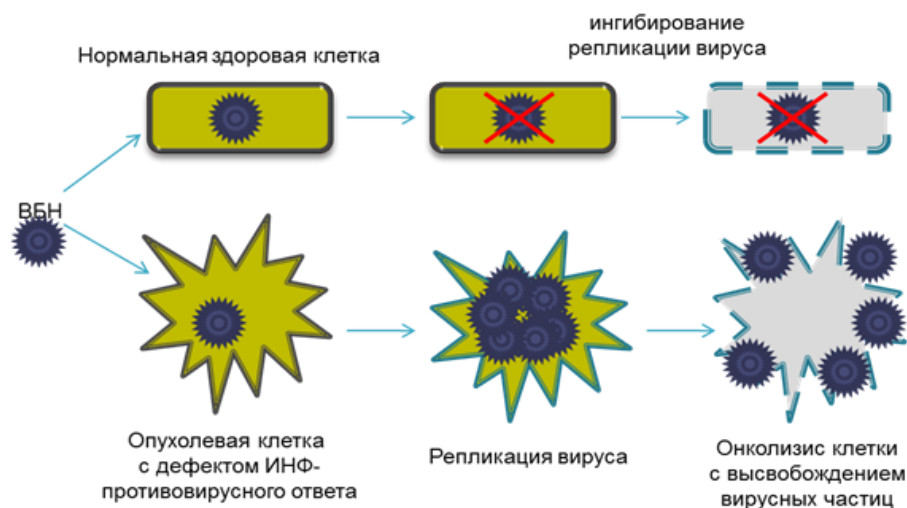


Рисунок 3. Избирательная репликация ВБН в опухолевых клетках (Cockle, 2018).

Кроме того, у нормальных клеток существует механизм борьбы с вирусами, предотвращающий вирусную репликацию, который у опухолевых клеток, как правило, нарушен. Когда вирус проникает в здоровую клетку, в ней формируется двойная спираль вирусной РНК (dsRNA), в ответ на обнаружение которой активируется протеинкиназа R (proteinkinase R, PKR) (Kumar, 1994). После связывания вирусной dsRNA протеинкиназа R димеризуется, происходит аутофосфорилирование с активацией киназного домена и активированная PKR затем связывается с фактором трансляции eIF2 α , который в норме необходим для синтеза белков. После связывания с PKR eIF2 α перестает выполнять свою функцию, в результате чего останавливается трансляция белков и блокируется синтез новых вирусных частиц (Рисунок 4).

Одновременно с этим в инфицированных вирусом опухолевых клетках, как правило, нарушена система клеточной противовирусной защиты, что связано, скорее всего, с избеганием надзора со стороны иммунной системы. Главным фактором противовирусной защиты клетки считается протеинкиназа R, и в подавляющем большинстве опухолевых клеток киназа не работает, что дает возможность вирусу нормально реплицироваться в раковой клетке, тогда как в здоровой клетке репликация тормозится. Кроме того, другие приобретенные мутации могут инактивировать интерферон-опосредованные защитные пути. Отсутствие интерфероновых ответов, считается, основным фактором селективной репликации вируса болезни Ньюкасла дикого типа в опухолевых клетках, в то время как другие вирусы подвергались модифицированию генома с целью увеличения селективности путем создания штаммов, чувствительных к интерфероновому ответу нормальных клеток (Kim, 2007).

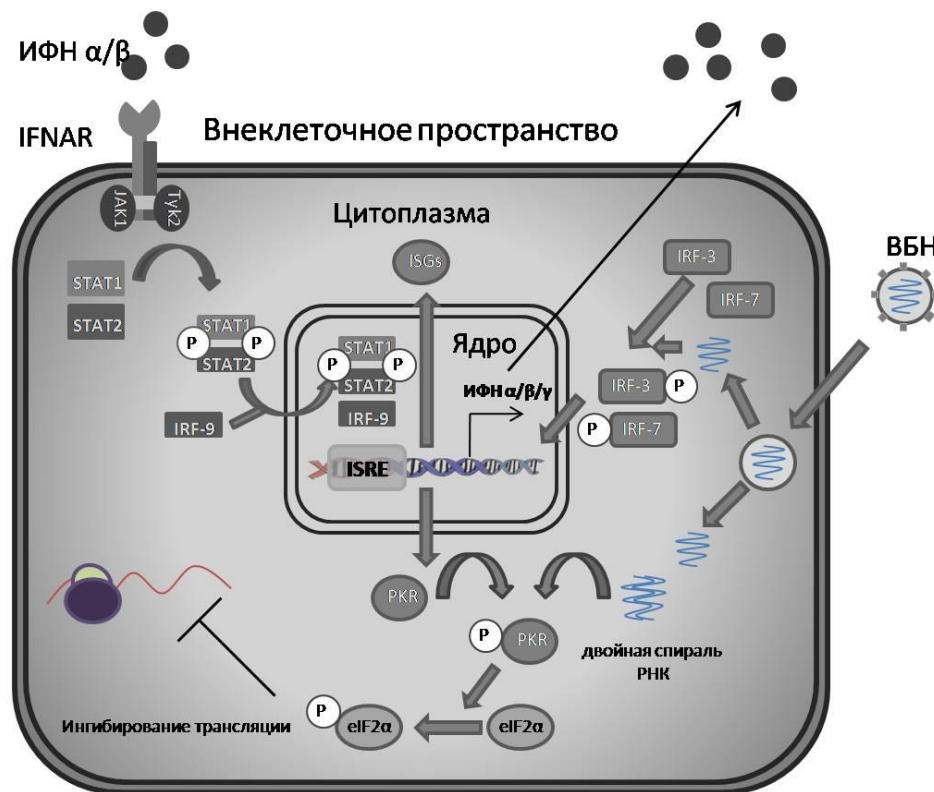


Рисунок 4. Клеточный противовирусный интерфероновый ответ нормальных клеток при инфицировании онколитическим вирусом болезни Ньюкасла. При попадании вируса путем фосфорилирования активируются ИФН-регулирующие факторы (IRF), усиливающие экспрессию генов ИФН 1 типа. ИФН $\alpha/\beta/\gamma$ высвобождаются во внеклеточную среду, где взаимодействуют со специфическими рецепторами IFNAR соседних клеток (Claudinon, 2009). Фосфорилированные по тирозиновым остаткам киназы Tyk2 и Jak1 активируют белки STAT1 и STAT2. В клетке образуется триммерный комплекс STAT1-STAT2-IRF9 - ИФН-стимулированный генный фактор 3 (ISGF3), который связывается с ИФН-стимулированными регуляторными элементами ISRE и способствует транскрипции генов ISGs (IFN-stimulated gene) (Jirillo, 2008), кодирующих белки,

которые формируют общее противовирусное состояние в инфицированных вирусом клетках и в соседних неинфицированных клетках.

ВБН способен реплицироваться в опухолевой клетке в 10,000 раз эффективнее, чем в нормальных клетках (Schirmacher, 2009). Новое потомство вирионов можно обнаружить в клетке уже через 3 часа после инфицирования (Ravindra, 2009). Активная вируспродукция позволяет создавать большое количество вирусных частиц, которые, высвобождаясь, заражают соседние опухолевые клетки.

Передача вируса между млекопитающими

Высокая контагиозность вируса болезни Ньюкасла способствует его быстрому распространению среди домашней птицы от зараженных особей к здоровым. В научной литературе отсутствуют подтверждения передачи вируса БН от инфицированного представителя млекопитающих к неинфицированному. В исследовании научной группы под руководством Fouchier R.A.M. и van den Hoogen B.G. было продемонстрировано наличие вируса во внутренних органах приматов (*Macaca fascicularis*) (селезенка, печень, почки, легкие) на 4 день после внутривенного введения серии возрастающих доз вируса болезни Ньюкасла, наработанного в аллантоисной жидкости (Vuijs, 2014). Инъекции ВБН не привели к тяжелым заболеваниям у животных. У здоровых приматов, подсаженных к инфицированным особям для изучения возможности передачи вируса, гематологические и биохимические показатели крови не изменялись, и спустя 21 день не было выявлено патологических изменений или признаков репликации вируса в организме здоровых животных, несмотря на использование в исследовании как вакцинных, так и мезогенных рекомбинантных штаммов ВБН. Несмотря на то, что инфицированные особи выделяли небольшое количество вируса, это не привело к сероконверсии контактных здоровых животных, что демонстрирует безопасность ВБН для внутривенного введения приматам.

Побочные эффекты

Изменение генома вируса с целью введения ограничений вирусологических свойств или улучшения противоопухолевой активности всегда связано с риском получения штамма, который может приобрести бóльший патогенный потенциал, чем имеет родительский вирус, или стать патогенным для ранее не чувствительных к вирусу видов организмов. Доказательством могут служить лабораторные исследования рекомбинантных вариантов вируса Синдбис, модифицированных с целью получения штаммов со сниженной способностью связывания с гепарансульфат-протеогликанами клеточных рецепторов и более эффективной вируспродукцией *in*

in vivo. Однако введение рекомбинантных вирусов новорожденным мышам приводило не только к увеличению продолжительности циркуляции вируса в организме, но и к росту смертности экспериментальных животных (Burnes, 2000). Встречается и быстрая адаптация вирусов с нестабильным геномом к новым средам обитания за счет появления и отбора мутантов, например, в процессе репликации в клетках нервной системы, при которой формируется приобретенная нейровирулентность штаммов (Lee, 2002).

При манипуляциях с генетическим материалом всегда есть риск получить вирус с нестабильным геномом, измененной токсичностью или патогенностью. Например, при введении гена П-4 в геном поксвируса наблюдается 100% летальность у предварительно вакцинированных животных, которые ранее были полностью невосприимчивы к вирусу дикого типа (Chen, 2011). Поэтому при анализе безопасности онколитических вирусов, которые являются кандидатами для клинических разработок, необходимо учитывать риски генно-инженерных изменений вируса, адаптации к конкретным клеточным линиям, использования вирусов с нестабильным геномом и естественно патогенных для человека штаммов.

Таким образом, соображения безопасности являются первостепенными драйверами выбора вируса для использования в разработках. Чтобы предотвратить развитие нежелательных побочных эффектов, имеет смысл отказаться от использования вирусов, патогенных для человека по своей природе и нуждающихся в модификациях генома, в пользу применения для разработки противоопухолевого онколитического агента диких вирусов, выделенных из природных резервуаров. Для онколитических ДНК-содержащих вирусов опухолевая избирательность часто определяется на транскрипционном уровне, включает взаимодействия с ядерными факторами транскрипции. ВБН относится к РНК-вирусам с одноцепочечной негативной РНК, что позволяет вирусу реплицироваться в цитоплазме вне зависимости от S фазы клеточного цикла, исключает встраивание вирусного генетического материала в геном клетки хозяина и минимизирует появление мутаций в геноме вируса. Важной частью жизненного цикла РНК-вирусов является образование двухцепочечной РНК, мощного стимулятора протеинкиназы, которая ингибирует синтез белка и способствует активации механизмов апоптоза в клетке, тем самым контролируя распространение вирусной инфекции в нормальных клетках. Кроме того через стимулирование высвобождения интерферонов сформированная двухцепочечная РНК активирует протеинкиназы соседних неинфицированных клеток, защищая их от вирусной инфекции.

Иммунитет

Большинство населения в течение жизни подвергается воздействию вирусных инфекций и профилактических вакцинаций, поэтому вероятность наличия уже сформированного иммунитета против многих представителей человеческих вирусов, применяемых в виротерапии, достаточно

высока, что может напрямую отражаться на эффективности терапии. В человеческой популяции часто встречается иммунитет против наиболее часто используемых в виро- и генной терапии аденовирусов 2-го (Ad2) и 5-го (Ad5) серотипов, что подавляет иммуногенность вакцинных и генотерапевтических векторов на их основе и требует дополнительных мер контроля (Yu, 2012; Yu, 2012a). При исследовании сывороток крови часто выявляются серопозитивные пациенты к вирусу кори, простого герпеса, эпидемического паротита (Asada, 1974; Audet, 2006; Luo, 2016). В случаях с такими пациентами естественные иммунологические реакции в их организме против препаратов на основе вирусов делают их клиническое применение ограниченным. Применение птичьего вируса болезни Ньюкасла в онкотерапии помогает исключить влияние распространенного противовирусного иммунитета в популяции.

При этом развитие клеточного противовирусного иммунного ответа, лежащее в основе безопасности нормальных здоровых клеток организма от вирусной инфекции, может служить препятствием для реализации полного онколитического потенциала вируса за счет быстрой элиминации прежде, чем вирус достигнет злокачественных клеток (Alvarez-Breckenridge, 2013; Taipale, 2016). В исследовательских работах показано, что ограничить и снизить эффективность онколитической активности вирусов может фагоцитарная система печени при системном введении инъекций (Bernt, 2003), система комплемента (Ikeda, 2000) и нейтрализующих антител, которые могут быть у пациента за счет воздействия вируса на организм до проведения онколитической виротерапии (Fisher, 2001).

Вирус болезни Ньюкасла как онколитический агент

Первое сообщение о вирусе болезни Ньюкасла в качестве возможного онколитического агента датируется 1952 годом, когда была продемонстрирована противоопухолевая активность штамма Массачусетс в отношении мышинной асцитной опухоли Эрлиха в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (Moore, 1952). До этого времени штаммы ВБН использовались исключительно для вакцинации птиц с целью предотвращения вспышек болезни Ньюкасла и ее распространения в птицеводческих хозяйствах. Однако уже в 1964 году были опубликованы первые результаты виротерапии человека вирусом болезни Ньюкасла. Внутривенное введение ВБН способствовало снижению бластных клеточных форм в периферической крови у пациента с острым миелоидным лейкозом (Wheelock, 1964). А в 1965 году были описаны положительные эффекты интратуморального введения 2.4×10^{12} частиц вируса пациенту с раком шейки матки – в результате вирусной инъекции наблюдали не только заметную регрессию объема опухолевой ткани, но и уменьшение метастазов в лимфатических узлах (Cassel, 1965). Задokumentированные в 50-х и 60-х годах XX века противоопухолевые эффекты ВБН положили начало многочисленным лабораторным исследованиям на клеточных культурах и животных моделях целого ряда штаммов

вируса болезни Ньюкасла с целью их изучения как перспективных кандидатов в борьбе с онкологическими заболеваниями (Cassel, 1965; Moore, 1952; Moore, 1954). На сегодняшний день результаты лабораторных и доклинических испытаний ВБН представлены в многочисленных англоязычных научных публикациях. Кроме того, противоопухолевый потенциал ВБН исследован в клинических испытаниях в США, Канаде, Китае, Германии и Венгрии. ВБН также включен Национальным институтом онкологии США (NCI) в перечень агентов для терапии злокачественных образований в рамках дополнительной и альтернативной медицины (НИИ, 2018а).

По способности инфицировать клетки человека и реплицироваться в них, исследуемые штаммы ВБН разделяют на две группы – литические и нелитические. Штаммы обеих групп проявляют избирательную тропность к опухолевым клеткам человека и реплицируются в них, но не в здоровых клетках (Krishnamurthy, 2006; Reichard, 1992; Schirmacher, 1999; Walter, 2012). Способность вируса реплицироваться в опухолевых клетках в 10,000 раз эффективнее, чем в нормальных клетках (Schirmacher, 2009), является преимуществом ВБН как кандидата на роль онколитического агента для использования в терапии рака. Основное отличие литических штаммов заключается в способности производить инфекционные вирусные частицы в ходе репликации в клетках человека, в то время как нелитические штаммы этого не могут из-за наличия инактивированных белков F и HN. Это отличие определяет механизм, по которому штаммы ВБН проявляют свой противоопухолевый потенциал. Литические штаммы производят инфекционные вирусные частицы с активированными белками F и HN, которые в свою очередь, высвобождаясь из клетки, способны за короткое время инфицировать соседние опухолевые клетки. Заражение литическими штаммами, как правило, сопровождается формированием синцитиев – крупных нежизнеспособных многоядерных клеток (Abdullah, 2014; Mansour, 2011). Синцитии образуются за счет слияния клеточных мембран соседних клеток, а точнее взаимодействия поверхностных вирусных белков HN и F, которые закрепляются на поверхности мембран этих клеток при инфицировании вирусом и в процессе формирования дочерних вирусных частиц. Таким образом, литический штамм убивает не только клетку, в которой реплицируется, но, создавая инфекционное потомство, лизирует соседние опухолевые клетки. Нелитические штаммы используют другой механизм уничтожения опухолевых клеток, связанный с нарушением метаболизма инфицированной клетки в процессе моноциклической репликации вируса.

В процессе исследования антинеопластических свойств литических и нелитических штаммов ВБН было предложено несколько возможных концепций реализации противоопухолевого потенциала ВБН для эффективного лечения опухолей, что привело к появлению разных подходов виротерапии.

Первый подход заключается в использовании литических штаммов ВБН для прямого селективного вирусного онколизиса злокачественных клеток. Основное преимущество этого

подхода заключается в быстром распространении цитотоксического эффекта на опухолевые клетки за счет эффективной репликации вируса с высвобождением многочисленного инфекционного вирусного потомства.

В основе другого подхода лежит идея использования вирусных антигенов для стимулирования неспецифического иммунитета посредством индукции цитокинов и интерферонов лучшего распознавания иммунной системой опухолевых антигенов и стимуляции цитотоксических клеток – натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов (Fournier, 2012; Fournier, 2013; Tayeb, 2015; Zamarin, 2012). Вирусные поверхностные белки при проникновении вируса в клетку остаются на мембране инфицированной клетки. При распознавании иммунной системой таких зараженных клеток они воспринимаются как чужеродные и подвергаются уничтожению, одновременно активируя иммунную систему против неинфицированных опухолевых клеток (Haas, 1998; Lam, 2011). Для доставки вирусных антигенов в опухолевые клетки применяют инъекции, как правило, нелитических штаммов ВВН или вирусные онколизаты, содержащие фрагменты плазматических мембран инфицированных вирусом клеток и клеточные вакцины, представляющие собой инфицированные вирусом слабо пролиферирующие раковые аутологические или аллогенные клетки.

Любые разрабатываемые лекарственные средства обязательно проходят доклинические исследования на клеточных культурах и животных моделях и в случаях получения успешных результатов продолжаются в клинических условиях. Доклинические эксперименты позволяют проанализировать действие вируса на уровне опухолевых клеток и опухолевой ткани животных при экспериментальном онкогенезе, оценить фармакологические свойства и изучить потенциальные терапевтические эффекты препарата на животных моделях заболеваний человека. Основная задача доклинических исследований заключается в демонстрации терапевтического эффекта на витальной и вивальной моделях и доказательстве безопасности лекарства с оценкой возможной токсичности. Инфицирование организма вирусом у людей и животных, как правило, очень схоже, поэтому результаты доклинических исследований можно сопоставлять с возможным действием препарата на человека и прогнозировать лечение пациентов. Исследования на животных дает представление о распределении вируса в организме, его кинетике, безопасности для здоровых тканей и позволяет разработать основные показания. Данные о фармакологических эффектах препаратов *in vitro* и *in vivo* оценивают предварительно и делают заключение о терапевтической ценности препаратов, тем самым получая обоснования применения разработки на людях. Для проведения клинических испытаний на человеке онколитических препаратов для виротерапии, вирусных вакцин и других вирусных биопрепаратов необходимо получить официальное разрешение. В США исследователи должны подготовить пакет документов с заявлением на проведение клинических испытаний (Investigational New Drugs, IND), которое после

одобрения правительственного агентства управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA), подчиненного министерству здравоохранения США, допускает начало I фазы клинических испытаний. После успешного завершения I, II и III фаз клинических испытаний подходят к подаче заявления на применение нового лекарства (New Drug Application, NDA) и рыночным исследованиям, после которых препарат может стать доступным для лечения (Пейдж, 2012). В Америке в IND был зарегистрирован единственный штамм вируса болезни Ньюкасла PV701 для исследования в качестве противоопухолевого агента (Pecora, 2002). Остальные клинические испытания штаммов ВБН проходили за пределами США.

К настоящему времени ряд клинических испытаний (I и II фазы) продемонстрировал наличие противоопухолевой активности в отношении опухолей разной этиологии и гистогенеза и безопасности штаммов ВБН для человека, среди которых литические (PV701, 73-T, MTH-68/H) (Cassel, 1965; Csatory, 1999; Csatory, 2004; Laurie, 2006; Pecora, 2002; Wagner, 2006) и нелитические штаммы (Ulster) (Bohle, 1990). Все штамма демонстрируют отсутствие токсичности и безопасность для нормальных клеток организма. Также показаны результаты различного способа введения вируса.

Рекомбинантные штаммы вируса болезни Ньюкасла

Одним из путей улучшения виротерапевтических свойств онколитических вирусов является селекция штаммов или генно-инженерная модификация генома вируса. При помощи конструирования рекомбинантных штаммов можно снизить патогенность вирусов и повысить тропность к опухолевым клеткам для избирательного лизиса или усилить чувствительность иммунокомпетентных клеток к неопластическим образованиям. Для онколитических вирусов простого герпеса, аденовирусов, поксвирусов или вируса кори модификация генома с целью повышения опухолевой селективности при инфицировании необходима, так как вирусы являются патогенными для человека. Таким образом, генетическая модификация направлена на снижение патогенности для нормальных здоровых клеток человека. Редактирование генома вакцинных штаммов представляет собой один из способов получения онколитических вирусов, которые могут реализовать свой виротерапевтический потенциал в организме человека, вакцинированного от вирусного заболевания и имеющего устойчивый специфический иммунитет против природного вируса, но не рекомбинантного. Вирус болезни Ньюкасла относится к группе вирусов, которые не требуют снижения патогенности, так как изначально ВБН апатогенен для человека. Являясь вирусом птиц, ВБН не вызывает развитие иммунного ответа у человека, который подавляет онколитические свойства и элиминирует вирусные частицы. В связи с этим зачастую для виротерапии используют природные нереконбинантные штаммы, которые проявляют высокий опухолеспецифический онколитический потенциал без каких-либо модификаций генома. Поэтому

цель создания генно-инженерных рекомбинантных штаммов ВБН, как правило, заключается в поиске новых вариантов модификаций генома для усиления онколитической активности вируса.

Генно-инженерные манипуляции с вирусным геномом направлены на усиление иммуноопосредованных противоопухолевых эффектов, которые могут реализовываться путем экспрессии иммуностимулирующих цитокинов с активацией лимфоцитов и дендритных клеток (ДК). Получен целый ряд рекомбинантных штаммов ВБН, экспрессирующие различные цитокины. Штамм *gsc* (GM-CSF) экспрессирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор показал стимулирующий эффект для мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) *in vitro* и повышение продукции ИФН-альфа и значительное увеличение ингибирования роста опухолевых клеток (Janke, 2007). Терапевтический потенциал сразу нескольких рекомбинантных штаммов, экспрессирующих различные иммуностимулирующие белки (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ИФН-гамма, ИЛ-2, ФНО-альфа), был оценен на иммунокомпетентных мышцах с карциномой толстой кишки CT26 в экспериментах Vigil A. с соавт. (Vigil, 2007). *In vivo* подкожные опухоли только после интратуморальных инъекций рекомбинантного штамма *rNDV/F3aa-IL-2*, экспрессирующего IL-2, показали резкое снижение скорости роста с последующей полной ремиссией опухолевых узлов у большинства леченных животных, в то время как штаммы, экспрессирующие ГМ-КСФ, ИФН-гамма и ФНО-альфа, продемонстрировали лишь незначительное улучшение онколитической активности по сравнению с родительским штаммом *rNDV/F3aa*. Рекомбинантный штамм со встроенным человеческим геном ИЛ-2 *Rec(IL-2)* оказывал стимулирующее действие на Т-клетки, демонстрировавшие повышение экспрессии CD69 и ИФН-гамма, и обладал высокой цитотоксической активностью (Janke, 2008).

Создание рекомбинантных штаммов на основе ВБН рассматривается как способ повышения онколитической активности природных противоопухолевых свойств вируса и усиления безопасности для здоровых клеток человека и селективной опухолеспецифической репликации. Однако в случае с модуляцией генома всегда существует опасность образования штамма с нестабильной РНК, что требует дополнительных мер по генетическому контролю препаратов на их основе. В случае с повышением фьюзогенных свойств существует ограничение использования таких рекомбинантных штаммов ВБН, так как не исключается, что при введении в геном многоосновных сайтов расщепления F-белка штамм может превратиться в высоковирулентный для птиц, что является потенциальной угрозой появления вспышек болезни Ньюкасла у домашней птицы. В связи с этим, исследования рекомбинантных фьюзогенных и мезогенных штаммов ВБН в качестве противоопухолевых агентов в последние годы были приостановлены USDA в связи с классификацией этих вирусов как потенциальных патогенных для птиц агентов из-за наличия многоосновного сайт расщепления F-белка.

Стратегия модуляции генома с целью регуляция механизмов клеточной гибели путем вставки трансгенов проапоптотических белков считается привлекательным подходом, который, однако, может ограничить реализацию онколитического потенциала. Индукция апоптотического сигнала рекомбинантным штаммом вируса и быстрая гибель опухолевых клеток на ранних этапах после инфицирования может привести к торможению мультициклической репликации вируса и распространения вирусного потомства на соседние клетки. Таким образом, активируя механизм клеточной гибели в зараженной клетке, ВБН теряет возможность реплицироваться и распространяться в опухолевой ткани и следовательно реализовывать свой эффективный онколитический потенциал.

Несмотря на то, что применение высоких доз цитокина ИЛ-2 было одобрено FDA для лечения ряда опухолей и данные о том, что штаммы ВБН, модифицированные ИЛ-2, демонстрируют усиление цитотоксического эффекта и проапоптотического ответа в опухолевых клетках, есть опасение сохранения токсичности при системном введении ИЛ-2, что существенно ограничивает широкое применение таких препаратов в клинике. Полученные данные о том, что мыши способны переносить высокие дозы ИЛ-2, определяемого в сыворотке, в отличие от человека и то, что ИЛ-2 не был обнаружен в сыворотке у мышей после виротерапии rNDV/F3aa-IL-2 в работах Vigil A. с соавт. (Vigil, 2007) позволяют предположить, что экспрессируемый ИЛ-2 при использовании рекомбинантного вируса будет нетоксичен и для человека. Однако имеющиеся данные о значительной дозозависимой токсичности ИЛ-2, связанной с выработкой большого количества биологически активных веществ и медиаторов воспаления, приводящей к отекам, нарушениям функций почек, сердечно-сосудистой системы, гепатомегалии, тромбоцитопении, анемии и лихорадки (Weber, 2015), остается небезопасным способом онкотерапии.

Механизм противоопухолевого действия вируса болезни Ньюкасла

В организме человека противоопухолевая активность ВБН может реализовываться по нескольким возможным механизмам. Во-первых, литические штаммы могут убивать опухолевые клетки в процессе жизненного цикла вируса за счет разрушения клеточной мембраны, когда вирусное потомство высвобождается из инфицированной опухолевой клетки и «одевается» в оболочку суперкапсида из клеточной мембраны клетки, модифицированной вирусными белками. Во-вторых, онколитические вирусы запускают в опухолевых клетках механизм программируемой клеточной гибели. В-третьих, противоопухолевое воздействие онколитических вирусов представляется куда более сложным процессом, чем просто лизис опухолевых клеток. Показано, что в процессе разрушения высвобождаются опухолевые антигены, провоспалительные цитокины и другие факторы, активирующие клетки иммунной системы, действия которых направлены против опухолевых клеток. Активация иммунитета может достигать настолько массивных

эффектов, что способствует разрушению не только первичного опухолевого узла, но и труднодоступных для диагностики и терапии метастазов по всему организму. Другой вариант предусматривает усиление иммунного ответа клеток после связывания вирусных белков нелитических штаммов с клеточной мембраной. Последний механизм заключается в выработке клетками цитокинов (ИФН- γ , TNF) в ответ на присутствие вирусных частиц. Цитокины в свою очередь активируют натуральные киллеры (NK-cells), макрофаги и сенсibilизированные Т-клетки (Ravindra, 2009). Натуральные киллеры выделяют белки-перфорины, которые, встраиваясь в мембраны опухолевых клеток, образуют в них поры, через которые в клетку поступает межклеточная жидкость, протеазы, разрушая ее путем апоптоза или осмотического лизиса.

Большинство научных статей, в которых предлагаются возможные механизмы вирус-опосредованной активации гибели опухолевых клеток, описывает апоптоз как основной специфический путь для ВВН инфицированных клеток в реализации цитотоксического противоопухолевого потенциала. Указывается также отдельно роль вирусных белков в реализации вирус-индуцированной апоптотической гибели клеток (Molouki, 2011; Rajmani, 2015). Однако за последние годы появились работы, направленных на изучение механизма индуцированного вирусом лизиса опухолевых клеток, которые описывают, что ВВН способен запускать в злокачественных клетках не только апоптоз, а также аутофагию (Meng, 2012) инекроз (Abu Bakar, 2012, Altomonte, 2010). Таким образом, необходимым этапом при изучении онколитического потенциала вируса является понимание механизма его действия на опухолевые и нормальные здоровые клетки.

Апоптотическая гибель

На моделях *in vitro* было показано, что ВВН реплицируется в цитоплазме клеток, индуцируя специфическое цитопатическое действие, характеризующееся округлением клеток, вакуолизацией, образованием синцития с последующей клеточной гибелью (Ravindra, 2009a). Вирусы могут индуцировать в клетках запрограммированную клеточную гибель. Апоптоз характеризуется морфологическими изменениями клеток, среди которых фрагментация ДНК, конденсация хроматина, потеря клеточных контактов, вакуолизация цитоплазмы, мембранный блеббинг, заканчивающийся формированием апоптотических тел (Ziegler, 2004).

В клетке существует несколько путей активации и трансдукции апоптотического сигнала, регуляция которых важна для поддержания тканевого гомеостаза, и удаления из организма поврежденных клеток (Young, 1997). Один из механизмов идет по митохондриальному пути, другой опосредован через мембранные «рецепторы смерти» (Рисунок 5).

Митохондриальный путь апоптоза регулируется белками семейства Bcl-2 (Bax, Bcl-2 и другие). Белок Bcl-2 и его гомологи (Bcl-xL, Mcl-1) блокируют проапоптотический комплекс

белков (прокаспазу-9, Аraf-1, АIF, цитохром с). Белок Вах, связываясь с Bcl-2, блокирует его антиапоптотические функции, в результате чего запускается каскад активации каспаз: цитохром С совместно с белком Аraf-1 активируют прокаспазу-9, в свою очередь активирующая эффекторную каспазу-3. В итоге разрушаются структурные белки и клеточные системы, активируются ДНКазы, АIF и эндонуклеазы разрушает ядерный аппарат (Galluzzi, 2012). Белок p53, отвечающий за контроль повреждений ДНК, также может стимулировать апоптоз клетки через инактивацию Bcl-2 в случаях, если репаративные системы не в состоянии устранить повреждения генетического материала клетки.

Другой механизм апоптоза опосредован связыванием специфического лиганда - FASL/CD95L, TNF α , TRAIL с соответствующим рецептором FAS/CD95, TNFR1, TRAILR. Изменение конформации рецептора приводит к связыванию DD-домена (deathdomain) с белком адаптером (FADD), который взаимодействует с прокаспазой-8. Комплекс CD95/FADD/прокаспазы-8 носит название сигнальный комплекс, индуцирующий смерть (death-inducing signaling complex, DISC). В этом комплексе активируется прокаспазы-8, которая в свою очередь активирует эффекторные каспазы, разрушающие клеточные структуры (Galluzzi, 2012).

Помимо внешнего и внутреннего механизма, к клеточной гибели по пути апоптоза могут приводить стресс эндоплазматического ретикулума, работа митоген-активированных киназ (МАРК) под действием клеточного стресса, воспалительных и других сигналов.

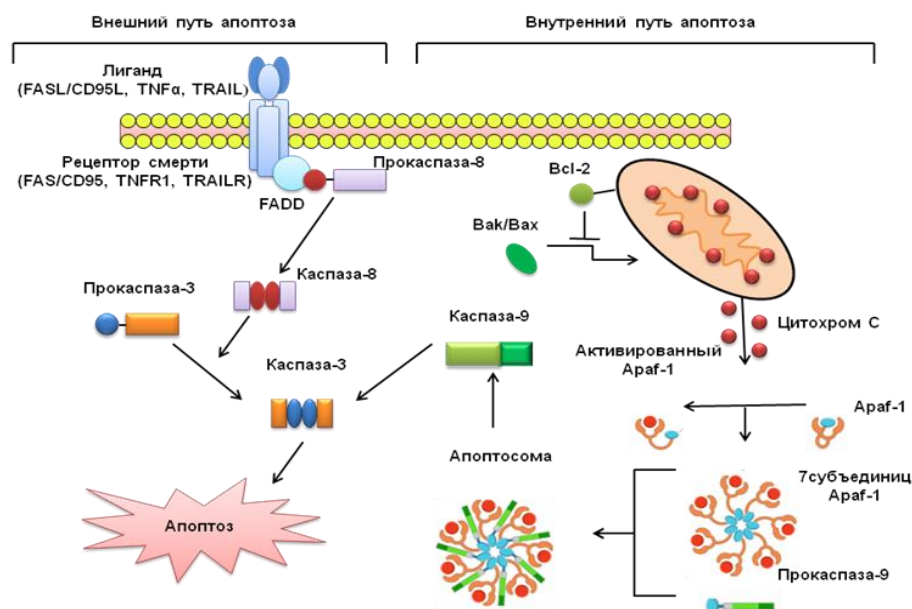


Рисунок 5. Механизм инициации апоптотической программы (Goldar, 2015).

ВБН способен индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, что было продемонстрировано в ряде работ с использованием разных опухолевых культур и разных вирусных штаммов (Lorense,

1988; Washburn, 2003; Zorn, 1994). Однако сам механизм, по которому ВБН запускает апоптоз, остается не ясен.

Показано, что вирулентные (мезогенные и везикулярные) штаммы способны индуцировать в опухолевых клетках более мощный апоптотический ответ и на очень ранних сроках взаимодействия вирус-клетка, в отличие от апатогенных штаммов и штаммов со сниженной вирулентностью (Bian, 2011; Ghrici, 2013). Однако какой именно путь активации апоптоза преобладает в инфицированных вирусом клетках остается неясным. Ранее в работах было отмечено, что штамм 73-Т ВБН способствует экспрессии TNF α и IFN α в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) (Lorense, 1988, Zorn, 1994). Это означает, что апоптоз может быть активирован по механизму внешнего пути клеточной гибели. По этому пути активации апоптоза действует штамм ВБН Ulster, стимулирующий экспрессию TRAIL-рецепторов (Washburn, 2003). Однако при исследовании штамма МТН-68/Н было показано, что помимо способности стимулировать экспрессию IFN α в клетках МКПК (Apostolidis, 2007), он способен индуцировать синтез оксида азота (NO) в макрофагах крыс и запускать апоптоз через стресс эндоплазматического ретикулума, что может активировать внутренний митохондриальный путь клеточной гибели (Fabian, 2007; Lam, 2011). По другим данным стресс эндоплазматического ретикулума не может быть главным активатором апоптоза в ВБН-инфицированных клетках немелкоклеточной карциномы легкого А549 (Bian, 2011). Таким образом, штаммы ВБН могут запускать каспаз-зависимую клеточную гибель как по внутреннему, так и внешнему пути активации апоптоза. Такое расхождение, касающееся активации механизма пути клеточной апоптотической гибели объясняется полученными результатами о комбинации внешнего и внутреннего путей апоптоза в ВБН-инфицированных клетках. Было отмечено, что на начальных этапах инфицирования активация апоптоза происходит преимущественно по внутреннему пути, а затем активируется внешний механизм апоптоза – сначала инфицирование ВБН опосредует изменение мембранного потенциала митохондрий и запускает высвобождение цитохрома с последующей активацией каспазы-9 на ранних этапах апоптотического процесса, после чего уже на более поздних сроках активируется каспаза-3, и в конечном счете активируется каспаза-8 (Elankumaran, 2006). Кроме того было показано, что препятствие развитию внешнего пути апоптоза путем ингибирования каспазы-8 не влияет на реализацию ВБН-опосредованной клеточной гибели, что говорит о преобладании митохондриального механизма запуска апоптоза при ВБН-инфекции опухолевых клеток. Также Ghrici M. с соавт. показали активацию каспазы-8 уже спустя 2 часа после инфицирования клеток МСF7 штаммом AF2240 в отличие от данных представленных Elankumaran S. с соавт. (Elankumaran, 2006) и Ravindra P. (Ravindra, 2009a), которые демонстрировали активацию каспазы-8 только спустя 48 и 24 часа, соответственно. Однако такой временной разброс активации каспазы-8 связан не с отличием порядка активации внешнего и

внутреннего путей апоптоза, а вероятно подтверждает зависимость скорости реализации апоптоза от вирулентности штамма.

Также есть данные и об активации МАРК-сигнального пути во время ВБН-индуцированного апоптоза в клетках A549, при которой активируются пути через ERK, JNK и p38 киназы, однако основную роль играет активация киназы p38-МАРК, не зависимо от патотипа штамма ВБН (Bian, 2011). При этом активация МАРК-сигнального пути происходит вероятно только на ранних этапах после инфицирования вирусом. Тогда как спустя 24 часа эту активацию нельзя заметить (Szeberenyi, 2003). Кроме того, подводя итог результатам работ, Szeberenyi J. с соавт. предположили, что МАРК-сигнальные пути не являются основными для опосредования апоптотических эффектов исследуемого ими штамма МТН-68/Н.

В клетках A549 при инфицировании штаммами разной вирулентности (LaSota - лентогенный, BeaudetteC - мезогенный, FMW - везогенный) показана активация каспазы-9 и каспазы-8, причем в одинаковый временной промежуток и независимо от патотипа штамма (Bian, 2011). Кроме того также активирована каспаза-3 и показана каспазо-зависимая ВБН-опосредованная цитотоксичность на ранних этапах (в первые сутки) после инфицирования клеток с каспаз-независимой литической активностью на более поздних этапах вирусной инфекции. Все эти данные свидетельствуют об одновременной активации как внешнего, так и внутреннего путей апоптоза в инфицированных клетках.

Объяснением наличия настолько противоречивых результатов в исследовании механизмов активации апоптоза и расхождений в выдвигаемых предположений о процессах клеточной гибели в ВБН-инфицированных опухолевых клетках может считаться различие самих онколитических штаммов ВБН, которые могут использовать различные механизмы индукции апоптоза возможно даже в конкретных линиях опухолевых клеток.

Было показано, что для реализации ВБН-индуцированного апоптоза в клетке необходима репликация и синтез вирусного белка *de novo* (Ravindra, 2008). Однако ответ на этот вопрос остается неоднозначным, так как помимо всего прочего, запустить механизм гибели может не только репликация вируса и синтез вирусного белка, но и взаимодействие клетки с поверхностными вирусными белками. Например, клеточную смерть индуцирует прикрепление вирусного поверхностного гемагглютинина (HN) с последующим слиянием частицы с клеточной мембраной на самых ранних этапах взаимодействия вирус-клетка (Ghrici, 2013). Научная группа из Индии демонстрирует на ряде работ влияние экспрессии вирусного белка HN на активацию апоптоза через JNK-сигнальный путь и активацию каспазы-8 (Rajmani, 2015), а также усиливает чувствительность клеток HeLa к действию TNF-альфаза счет торможения транскрипции ядерного фактора NF-κB, ответственного за контроль апоптоза (Rajmani, 2016). При этом активация JNK-пути считается основным событием в активации апоптоза на данной клеточной линии.

Помимо белка HN апоптоз может индуцировать матричный белок вируса болезни Ньюкасла, располагающийся на внутренней поверхности вирусной оболочки. Проапоптотический эффект М белка был продемонстрирован при инфицировании клеток HeLa (Molouki, 2011) и НСТ116 и НТ29 (Molouki, 2012) малайзийским штаммом AF2240. Многочисленные молекулы М-белка высвобождаются внутрь клетки при попадании вирусной частицы, связываясь с эндогенным человеческим Вах, вызывая его конформационные изменения и выступая активатором внутреннего пути апоптоза клетки путем активации Вах, его транслокации на наружную мембрану митохондрий и последующего высвобождения цитохрома с. Механизм реализации проапоптотического эффекта при взаимодействии М-белка с клеткой объясняется наличием ВНЗ-подобный домена в N-концевом сегменте гене М-белка, а при его инактивации наблюдается пятикратное снижение смертности клеток по механизму апоптоза по сравнению с ВНЗ-подобным доменом дикого типа.

Некроз (некроптоз)

Вирус болезни Ньюкасла способен привести к уничтожению опухолевых клеток по механизму некротической гибели. Некроз может проходить под контролем клеточных сигнальных путей, являясь также как и апоптоз процессом регулируемой клеточной гибели. Цитопатический эффект реализуется через кариолизис, набухание клеток последующим их распадом и высвобождением цитоплазматического содержимого во внутриклеточное пространство и развитием воспалительного процесса.

Koks С. с соавт. было показано на модели *in vitro*, что гибель клеток глиомы линии GL261 при инфицировании штаммом ВВН со сниженной вирулентностью Hitchner В1 морфологически схожа с процессами, характерными для некротических изменений – разрушение мембраны, набухание, отек и распад клеточных структур, кариолизиси присутствие в большом количестве клеточного дебриса, но, тем не менее, процесс гибели клеток не сопровождался неупорядоченным разрушением, как это бывает при некрозе (Koks, 2015). Снижение жизнеспособности шло по программированному пути гибели - некроптозу.

Некроптоз представляет альтернативную форму программируемой клеточной гибели, в реализации механизма которой главную роль играют протеинкиназы RIPK-1 и RIPK-3 с последующим формированием комплекса RIP1/RIP2, получившего название некросома (Galluzzi, 2011). RIP1/RIP2-некросома обеспечивает пронекротические сигналы, которые активируют цитозольную Ca⁺-зависимую нейтральную протеинкиназу (кальпаины, CANP) и сфингомиелиназу, индуцирующие пермеабиллизацию лизосомальной мембраны (LMP), c-Jun N-терминальную киназу и (JNK)-опосредованный сигнальный каскад, который усиливает рецептор опосредованную

некротическую гибель. Все эти процессы приводят к образованию высокого уровня активных форм кислорода (АФК), которые повреждают ДНК, белки и липиды.

Некроптозом принято называть случаи RIP1- или RIP3- зависимого регулируемого некроза (Galluzzi, 2012). Супрессирование RIPK-1 химическим ингибитором некростатином-1, блокирует необходимую активацию сигнального каскада при развитии некроптоза, и при этом значительно снижается цитопатическое действие вируса болезни Ньюкасла после инфицирования клеток глиом GL261.

Некроптоз может запускаться опосредованно через рецепторы смерти, среди которых трансмембранный белок I типа CD95 (Fas/APO-1), рецепторы фактора некроза опухоли TNFR1(CD120) и TNFR2, рецепторы TRAILR1 и TRAILR2 для вызывающего апоптоз лиганда суперсемейства TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 and 2). Эти рецепторы также активируют внешний путь механизма программируемой клеточной смерти – апоптоз. Выбор биохимического сигнального каскада, таким образом, зависит от характеристик клеток, как например фаза клеточного цикла, дополнительных внутри- и внеклеточных сигналов.

Однако при ингибировании каспазной активности и блокировании каспазо-зависимого пути апоптоза, реализация программы гибели клеток при активации рецепторов смерти проходит по альтернативному каспазо-независимому пути, напоминающему некротические изменения. Кроме этого некроптоз может запускаться в присутствии молекул PAMPs, связанных с патогенами, которые распознаются клетками иммунной системы через толл-подобные рецепторы (TLRs), или при повреждении ДНК (Vandenabeele, 2010).

Некротические изменения опухолевой ткани гепатоцеллюлярной карциномы после введения рекомбинантного штамма вируса болезни Ньюкасла rNDV/F3aa(L289A) через печеночную артерию были также описаны на мышинной модели в условиях *in vivo*. Морфометрический анализ опухолевого материала позволил выявить динамику увеличения некротических полей в опухолевой ткани. При этом наблюдалось большое число синцитиальных многоядерных клеток в раке печени, а гистологические исследования здоровой ткани, окружающей опухоль, не обнаружили гепатотоксичности – не было образования синцития в окружающей ткани и отсутствовали воспалительные инфильтраты (Altomonte, 2010).

Подтверждение появления некротических процессов в опухолевой ткани при интратуморальном введении вируса болезни Ньюкасла *in vivo* представила в своих результатах научная группа из Китая (Sui, 2017). Интратуморальное введение природного штамма NDV-D90, запускающего апоптоз в клетках аденокарциномы легкого и рака желудка разной степени злокачественности, приводит к некротическим изменениям в опухолевой ткани клеток рака желудка BGC-823, привитых иммунодефицитным мышам Nude-линии.

Аутофагия

Помимо общепринятого представления о том, что вирус болезни Ньюкасла активирует апоптотическую клеточную гибель, ряд работ подтверждает способность ВБН-опосредованной инфекции запускать аутофагию в опухолевых клетках человека. Сам процесс аутофагии физиологически важен для клеток, так как сохраняет гомеостаз клетки с способствует выживаемости, поддерживая основные клеточные процессы, защищает в стрессовых условиях, в том числе от попавших в клетку патогенов вирусной природы.

Клетки в состоянии аутофаговой клеточной гибели морфологически отличаются обширной вакуолизацией цитоплазмы, набуханием митохондрий и цистерн эндоплазматического ретикулума и увеличением аппарата Гольджи. Отличительным признаком аутофагии является образование двумембранных участков цитоплазмы - аутофагосом, содержание которых подвергается лизосомальной деградации.

Основным регуляторами аутофагии является ингибиторсерин/треонин протеинкиназа mTOR (mammalian target of rapamycin) (Zhivotovsky, 2010), регулирующая рост, пролиферацию и выживание клеток, синтез белков и транскрипцию. При нарушении регуляции уровня питательных веществ и энергии в клетке, а также окислительно-восстановительного статуса, в клетках активируются компоненты киназного комплекса ULKs-Atg13-FIP200 с инактивацией mTOR, тем самым инициируется индукция аутофагии (Yang, 2010).

Процесс запуска (инициации) аутофагии требует присутствия инициаторного комплекса PtdIns3K, основным компонентом которого является Beclin-1. Функция Beclin-1 регулируется при помощи антиапоптотического белка Bcl-2, который ингибирует процесс аутофагии, связывая Beclin-1. Чтобы запустить механизм аутофагии, необходимо отделить Beclin-1 от Bcl-2. Дальнейшее развитие процесса (элонгация) происходит в присутствии двух убивкитиноподобных конъюгирующих систем, в одной из которых принимают участие продукты специфических для аутофагии генов Atg (autophagy-related gene) с образованием комплекса Atg5-Atg12, а другой требует расщепления белка LC3I (protein 1 lightchain 3) и конъюгации с PE (фосфатидилэтанолами) с образованием комплекса LC3II-PE, необходимого для формирования аутофагосомы. Последующее слияние аутофагосомы с лизосомой контролируется интегральным трансмембранным белком LAMP-2, который служит рецептором для белков, которые должны быть доставлены в лизосому из цитоплазмы. После слияния содержимое подвергается деградации под действием кислых гидролаз.

Исследования, посвященные оценке противоопухолевой роли аутофагии, имеют противоречивые результаты. С одной стороны, на ранних этапах развития опухолевых клеток аутофагия обладает этим противоопухолевым эффектом. К примеру, известно, что активация онкогена c-myc индуцирует гибель клеток по пути аутофагии, а у мышей, дефектных по гену

Beclin-1, чаще встречаются карцинома легких и лимфома. Но, с другой стороны, раковые клетки зачастую используют аутофагию как способ выживания при анемии, гипоксии, лучевой терапии и действии противоопухолевых препаратов, которые индуцируют апоптоз, что ведет к приобретению лекарственной устойчивости (Takeuchi, 2009).

Аутофагия также играет роль в устранении патогенов, которые попадают в клетку, реализуя цитопротекторный эффект и действуя как механизм защиты хозяина. Активация процесса аутофагии в ответ на присутствие бактерий и вирусов в клетке начинается с передачи сигнала с мембранных Toll-like рецепторов (TLRs), расположенных на поверхности клеток и на эндосомах. Сигнал стимулирует транскрипцию генов, отвечающих за воспаление и противовирусную иммунную реакцию. Существует еще один противовирусный сигнальный путь, который включает активацию аутофагии через PKR (proteinkinase R) и eIF2a киназу. Некоторые вирусы выработали механизм подавления аутофагии (Kudchodkar, 2009). Известно, что присутствие вирусных белков способно приостанавливать механизм аутофагии, например, как это делает HSV-1 (herpes simplex virus type 1), который ингибирует аутофагию, взаимодействуя с Beclin-1 (Orvedahl, 2007). Другие вирусы приспособились использовать аутофагию для повышения эффективности собственной репликации (Kudchodkar, 2009).

ВБН-индуцированная аутофагия описана в нескольких исследованиях. При инфицировании клеток глиомы U251 мезагенным штаммом ВБН Beaudette C наблюдали увеличение уровня LC3II и снижение p62, что отражает образование аутофагосом, и индукцию полного аутофагического ответа, при котором активация аутофагии идет по сигнальному пути через PI3K-киназу класса III и Beclin-1. Кроме того было показано, что ингибирование процесса аутофагии снижает производство вирусного потомства, что свидетельствует о способности ВБН использовать аутофагию для увеличения эффективности вируспродукции (Meng, 2012). Последующие исследования влияния штамма со сниженной вирулентностью LaSota на клетки немелкоклеточного рака легкого A549 показали, что аутофагия способствует успешной вируспродукции ВБН за счет блокирования каспаз-зависимого апоптоза в опухолевых клетках, вследствие чего облегчается репликация ВБН в клетках (Meng, 2014). Важная регуляторная функция механизма регуляции аутофагии и апоптоза в клетке в ответ на инфицирование ВБН была определена для белка p62 sequestosome 1 (SQSTM1), который связывается субквитинированными субстратами посредством домена UBA (ubiquitin-associated) и белком LC3 (microtubule-associated protein 1 lightchain 3) и индуцирует митофагию со снижением уровня цитохрома с и, как следствие, ингибированию развития процесса апоптоза. Таким образом, p62 блокирует апоптоз и способствует репликации ВБН.

С другой стороны механизм реализации ВБН-индуцированной клеточной гибели, связанной с активацией апоптоза и аутофагии, вероятно намного сложнее, так как эксперимент по

исследованию взаимосвязи аутофагии и апоптоза на инфицированных штаммом ВБН/FMW клетках A549 с лекарственной устойчивостью продемонстрировал различные эффекты. NDV/FMW индуцирует образование аутофагосом в паклитаксел-устойчивых и родительских клетках A549, однако ингибирует аутофагический процесс в клетках A549 с устойчивостью к цисплатину, при этом индуцируя апоптоз в цисплатин-резистентных клетках, что согласуется с исследованиями Meng G. с соавт. (Meng, 2014) о препятствии аутофагии при запуске апоптотической программы. Кроме того механизм активации сигнальных путей аутофагии в лекарственно-резистентных клетках A549 отличается от описанного Meng C. с соавт. (Meng, 2012) и реализуется через киназу PI3K класса I – Akt – mTOR; сигнальный путь киназа PI3K класса III – Beclin-1 контролирует аутофагию на начальных этапах (Jiang, 2014). Помимо этих данных было показано, что аутофагия не влияет на эффективность вируспродукции в инфицированных лекарственно-резистентных клетках и кроме того, что предварительная обработка клеток ингибитором аутофагии CQ усиливает ВБН/FMW-опосредованный противоопухолевый эффект в A549 клетках с устойчивостью к цисплатину через ингибирование аутофагии, в то время как обработка индуктором аутофагии – рапамицином - улучшает онколитический эффект от ВБН/FMW в A549 клетках с устойчивостью к паклитакселу путем повышения уровня аутофагии. Эти данные позволяют предположить, что комбинированное введение модуляторов аутофагии с онколитическими вирусами ВБН может улучшить виротерапию клеток рака легких, устойчивых к различным химиотерапиям. Возможно, различие стратегий, которые регулируют клеточные механизмы реализации аутофагии при ВБН-инфекции, зависит от роли процесса аутофагии в конкретных типах клеток рака легких с определенной лекарственной устойчивостью.

Согласно данным других научных исследований, при инфицировании клеток ВБН отмечают также участие аутофагии в формировании запрограммированной клеточной гибели в обход апоптозу. Инфицирование клеток глиомы GL261 лентогенным штаммом ВБН Hitchner V1 приводит к гибели клеток с характерными морфологическими признаками некроических изменений - клеточной дезинтеграции, клеточный отек, обширные кариолизис и наличие большого количества клеточных остатков. Маркеры апоптоза также не были выявлены. Однако клеточная гибель при этом развивается не случайным неупорядоченным образом, что характерно для некроза, а как запрограммированный некроптозис с постепенным снижением выживаемости опухолевых клеток (Koks, 2015). При этом было также отмечено, что на ранних этапах вирусного инфицирования (спустя 2 часа) регистрируется высокий уровень маркера индукции аутофагии LC3-II и снижение уровня маркера деградации аутофагии p62. Однако спустя 96 часов наблюдается снижение активности аутофагических процессов и рост некроптических.

Возможно, ингибирующий эффект аутофагии на индукцию апоптотической гибели опухолевых клеток при инфицировании ВБН дает возможность реализации программы клеточной гибели через альтернативный программируемый путь клеточной смерти.

Иммуногенная клеточная гибель и иммуноопосредованный механизм противоопухолевого действия ВБН

Воспаление представляет собой универсальный процесс, состоящий из комплекса реакций, направленного на генетически запрограммированную активацию защитных факторов системы в ответ на повреждение и устранение причины повреждения с последующим восстановлением ткани и ее функций. Молекулярные агенты, ассоциированные с повреждениями (DAMP), приводят к развитию неинфекционного воспалительного ответа. Среди таких молекул, связанных с повреждением собственных клеток, внутриклеточные белки теплового шока (HSP) и фрагменты из межклеточного матрикса - фибронектин, фибриноген, олигосахариды гиалуроновой кислоты, а также АТФ, ДНК и стрессорные молекулы. DAMP-молекулы распознаются Toll-подобными рецепторами (TLR) на поверхности клеток и запускают сигнальные пути, приводящие к активации воспалительного процесса за счет синтеза провоспалительных цитокинов.

Онколитические вирусы опосредовано участвуют в формировании провоспалительной среды от умирающих опухолевых клеток, которая создает предпосылки для противоопухолевых иммунных реакций (Lichty, 2014).

В реализации виротерапевтического потенциала ВБН иммуногенная клеточная гибель выступает как механизм индукции иммунного ответа и поддержания долгосрочной регрессии опухоли. Вклад иммуногенной клеточной гибели в реализацию противоопухолевого терапевтического ответа при инфицировании ВБН на модели глиомы было продемонстрировано в работах Koks С. с соавт. Иммуногенная ВБН-опосредованная клеточная гибель сопровождается высвобождением молекул DAMP, среди которых Ca^{2+} -связывающий белок кальретикулин и белок теплового шока HMGB1, с последующим развитием процесса некроптоза в опухолевых клетках. Эксперимент *in vivo* показал, что виротерапия лентогенным штаммом ВБН Hitchner-B1 приводит не только к долгосрочной выживаемости, но и несет протекторный эффект от повторного заражения и развития опухоли, что говорит об активации опухоль-специфического адаптивного иммунного ответа. Наблюдался рост уровня антигена PMEL17, ассоциированного с глиомой, и инфильтрацию IFN-гамма+ CD4+/CD8+ Т-лимфоцитов.

Кроме прямого цитотоксического воздействия вируса болезни Ньюкасла на опухолевые клетки, противоопухолевый потенциал реализуется путем ВБН-опосредованной активации врожденного иммунного ответа. ВБН индуцирует рост производства таких цитокинов, как ИФН I типа, RANTES, ИЛ-12, ГМ-КСФ, и способствует презентации антигенов.

Вирусный белок HN выступает в качестве мощного антигена, усиливая иммунную функцию цитолитических Т-клеток против инфицированных опухолевых клеток.

Активация ВБН-опосредованной клеточной гибели приводит к изменению опухолевого микроокружения, которое из иммуносупрессивной среды превращается в провоспалительную, поддерживающую противоопухолевые иммунные ответы.

Несмотря на то, что по результатам серодиагностики уровень обнаруживаемых специфических антител ВБН в сыворотке человека минимален по сравнению с другими онколитическими вирусами, тем не менее, развивается хороший иммунный ответ против ВБН.

Цитотоксическая активность ВБН способствует активации натуральных киллеров (NK-клеток), которые оказывают значительный противоопухолевый эффект на раковые клетки, включая индукцию TRAIL (Song, 2013). Натуральные киллеры являются основным компонентом врожденной иммунной системы, а также выступают в качестве первой линии защиты против вторжения патогенных микроорганизмов и вирусов до запуска адаптивных иммунных ответов. Так в ответ на введение вируса через печеночную артерию в опухолевой ткани гепатоцеллюлярной карциномы происходит накопление NK-клеток, которые опосредуют прямой лизис клеток-мишеней путем высвобождения цитотоксических молекул, содержащих литические ферменты, или путем связывания с индуцирующими апоптоз рецепторами на клетках (Altomonte, 2010).

ВБН активирует макрофаги, которые увеличивают синтез своих ферментов (аденозиндезаминаза, индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS), лизоцим, кислая фосфатаза) и выделяются противоопухолевые эффекторные молекулы, среди которых оксид азота (NO) и фактор некроза опухоли (ФНО) (Schirmacher, 2000). Активация мышинных макрофагов селезенки и перитонеальных макрофагов под воздействием штаммов Ulster и LaSota демонстрирует противоопухолевую активность при совместном культивировании с разными опухолевыми клетками, в том числе клетками карцином молочной железы и легкого, лимфомы, мастоцитомы. В экспериментах *in vivo* после внутрибрюшинного введения мышам вируса Ulster полученные перитонеальные макрофаги также продуцировали высокий уровень макрофагальных ферментов и демонстрировали высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток. Антиметастатический эффект повторных инъекций LaSota-активированных макрофагов демонстрирует значительную супрессию метастазирования в легкие при раке молочной железы и карциноме Льюиса, а также способствует увеличению продолжительности жизни.

Исследования Washburn В. с соавт. показывают, что совместное культивирование нелитического штамма Ulster эффективно активирует экспрессию TRAIL на поверхности человеческих моноцитов и что данная активация может проходить без вирусной репликации (Washburn, 2003). При этом активированные моноциты убивали разные опухолевые клетки с

различной эффективностью. Была выявлена более высокая чувствительность опухолевых клеточных линий карциномы молочной железы BT20 и карциномы толстой кишки Colo205 для противоопухолевой активности ВВН-стимулированных моноцитов по сравнению с чувствительностью клеток карциномы молочной железы MCF-7 и пищевода Colo680N.

Хотя онколитические вирусы могут эффективно работать как самостоятельный противоопухолевый агент в экспериментальной терапии, их комбинация с другими традиционными методами онкотерапии может повысить эффективность лечения, поэтому онколитические вирусы могут составлять важный компонент комбинированной терапии. Соответственно, в настоящее время широко изучается комбинация онколитических вирусов не только со стандартными методами, но и с многими другими агентами экспериментальной терапии опухолей.

Опухолевый неоангиогенез и онколитические вирусы в качестве антиангиогенных терапевтических агентов

В начале опухолевой трансформации формирующиеся злокачественные новообразования получают питательные вещества и кислород путем простой диффузии из окружающих тканей. Дальнейшее развитие злокачественной прогрессии и рост опухолевой массы с последующей инвазией и метастазированием возможно только в условиях прорастания новообразованных сосудов и формирования собственной внутриопухолевой сосудистой сети для обеспечения питания растущей опухолевой ткани. Изучение механизмов активирования опухолевого неоангиогенеза и его возможного ингибирования привело к появлению нового направления терапии злокачественных образований, целью которой является торможение опухолевого ангиогенеза различными способами, включая блокирование пролиферации и жизнеспособности эндотелиальных клеток путем снижения уровня ангиогенных факторов и нарушения активации рецепторов к ним.

Регуляция опухолевого ангиогенеза находится под контролем множества сигнальных факторов, которые взаимодействуют с активирующими или ингибирующими поверхностными рецепторами эндотелиальных и других типов клеток. В целом неоангиогенез в злокачественных опухолях является результатом нарушения баланса факторов активации и ингибирования ангиогенеза. Помимо этого эндотелиальные клетки могут становиться резистентными к ингибиторам ангиогенеза.

В физиологической норме процессы ангиогенеза активны только во время эмбриогенеза и онтогенеза, во взрослом же организме повышение интенсивности происходит при формировании плаценты, овуляции и регенеративных процессах при заживлении ран и рубцевании. Опухолевый ангиогенез – патологический процесс, который начинается с продукции опухолевыми

клетками митогенных факторов в условии гипоксии –гипоксия-индуцибельных факторов (HIF), которые изменяют транскрипцию многих генов клетки, белковые продукты которых активируют неоангиогенез и изменяют свойства эндотелиальных клеток и сосудов в целом.

Факторы HIFзапускают синтез стимуляторов процесса ангиогенеза, среди которых эндотелиальные факторы роста (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), ангиопоэтины (ANG-1, -2), интерлейкин-8 (IL-8), трансформирующий фактор роста-бета (TGF-бета). Регуляция ангиогенеза также находится под контролем ингибиторов, представленных тромбоспондинами-1, -2 (TSP-1, 2), ангиостатинами, эндостатином и другими факторами. Ключевое значение в регуляции неоангиогенеза отводится семейству гликопротеинов VEGF и их родственным тирозинкиназным рецепторам, которые считаются главными медиаторами ангиогенеза (Falcon, 2016). Основной активирующий ангиогенез белок, который наиболее хорошо изучен среди всех факторов семейства VEGF, является сосудистый эндотелиальный фактор роста - А (vascular endothelial growth factor, VEGF-A), который инициирует процесс неоангиогенеза, стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток и регулирует их выживаемость, способствует повышению проницаемости сосудов. Высвобождающиеся ферменты участвуют в растворении базальных мембран, окружающих кровеносные сосуды, через образовавшиеся отверстия пролиферирующие эндотелиальные клетки мигрируют в опухолевую ткань. Матриксные металлопротеиназы эндотелиальных клеток обеспечивают продвижение ЭК к опухоли через окружающую строму. При этом образующаяся опухолевая сосудистая сеть отличается от нормального сосудистого русла по архитектонике, имея плохо сформированную базальную мембрану и неплотные межклеточные контакты, и свойствам и представляет собой неупорядоченную сеть извилистых сосудов с высокой проницаемостью.

Экспрессия гена VEGF усиливается не только при гипоксии, но и при онкогенной сигнализации. Повышенный уровень экспрессии VEGF-A характерен для различных типов опухолей таких, как опухоли легкого, молочной железы, ЖКТ, а также в метастатических узлах. Поэтому высокий уровень секреции данного фактора в первичных опухолевых узлах считается прогностическим маркером злокачественности опухоли. На моделях *in vivo* показано его активирующее действие VEGF-A для неоангиогенеза. Другие факторы такие, как VEGF-B, -C, -D, -E и PLGF также вносят вклад в развитии патологического ангиогенеза в опухоли.

Для внутриопухолевых эндотелиальных клеток ряда опухолей отмечается гиперэкспрессия рецепторов к VEGF-A. Фактор VEGF-A связывается с двумя тирозинкиназными рецепторами VEGF 1–го типа (VEGFR1, Flt-1) и VEGF 2–го типа (VEGFR2, Flk-1/KDR), которые экспрессируются эндотелиальными клетками кровеносных сосудов. Причем, несмотря на то, что специфичность связывания VEGF-A с рецептором VEGFR-1 в 10 раз выше, чем связывающая способность фактора с рецептором VEGFR-2, именно рецептор второго типа играет основную

роль в развитии VEGF-индуцированного сигналинга и, таким образом, является главным рецептором в реализации проангиогенных свойств VEGF-A (Shibuya, 2013). Особо важно, что VEGFR-2 считается основным регулятором ангиогенеза опухоли, что позволяет изучать данный рецептор как главную мишень в антиангиогенной терапии злокачественных опухолей (Gonzalez-Perez, 2013).

Исследование основных регуляторов ангиогенеза — VEGF и его рецепторов — привело к разработкам таргетных препаратов, направленных на избирательное воздействие на разных уровнях VEGF-сигнального пути. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что ингибированием VEGF-опосредованного ангиогенеза можно добиться торможения роста новых и снижение функционирования имеющихся сосудов в опухоли, а также регулирования выживаемости эндотелиальных клеток. Разработаны и применяются лекарственные препараты, точками приложения которых, как правило, являются сам эндотелиальный фактор роста сосудов VEGF-A, рецепторы VEGFR-1 и -2 и внутриклеточные сигнальные пути рецепторов VEGF. При этом подавляющее большинство известных ингибирующих ангиогенез препаратов направлены на сигнальные пути рецепторов VEGFR, основное действующее вещество которых представлено ингибиторами тирозинкиназ.

Однако отмечается большое число побочных эффектов от системного применения подобных препаратов, связанные с отсутствием высокой избирательности для опухолевой ткани. Препараты могут воздействовать также на здоровые ткани, что приводит к гипертонической болезни, сердечной недостаточности, нарушению работы почек, угнетение работы костного мозга с развитием анемии, нейтропении, тромбоцитопении (Escalante, 2016; Kristensen, 2014). Помимо побочных эффектов было показано, что существует резистентность для ряда опухолей в ответ на антиангиогенное воздействие терапевтических препаратов (Bottsford-Miller, 2012). Лекарственная устойчивость возникает за счет способности отдельных популяций опухолевых клеток усиливать активность альтернативных проангиогенных путей и проявлять устойчивость к гипоксии.

Помимо онколитического действия направленного на прямое уничтожение опухолевых клеток и опосредованной активации иммунной системы против опухоли онколитические вирусы привлекли внимание своими относительно недавно выявленными антиангиогенными свойствами, описанными в доклинических и клинических исследованиях (Breitbach, 2011; Hou, 2014; Ikeda, 2009; Kottke, 2010; Saito, 2006; Zhang, 2012) .

Онколитические вирусы могут инфицировать непосредственно сами опухоль-ассоциированные эндотелиальные клетки, реализуя природный антиангиогенный потенциал (Angarita, 2013), или быть вектором для адресной внутриопухолевой доставки антиангиогенных трансгенов (Zhang, 2012), локальная экспрессия которых в опухолевом микроокружении позволяет регулировать неоангиогенез и снижать возможные побочные эффекты для здоровых тканей.

Механизмы реализации вирусного антиангиогенного воздействия до конца не ясны. Известно, что вирусы могут воздействовать как на кровеносные сосуды, находящиеся в опухолевом окружении, так и на процессы внутриопухолевого неоангиогенеза. При этом считается, что вновь образующиеся в опухолевой ткани сосуды более восприимчивы к инфицированию, чем уже имеющиеся в опухоли. Предполагается, что вирусы инфицируют ЭК, попадая в них через обращенную в просвет сосуда люминальную поверхность. Однако возможно и вторичное инфицирование ЭК через базальную мембрану из опухолевой ткани. Онколитические вирусы напрямую разрушают внутриопухолевые ЭК, опосредованно стимулируют иммунный ответ как реакцию на повреждение сосудов (Breitbach, 2011) и экспрессируют вирусные белки с антиангиогенными свойствами (Ikeda, 2009).

Антиангиогенные свойства описаны среди онколитических аденовирусов, вируса везикулярного стоматита, реовируса, вируса простого герпеса, осповакцины, вируса болезни Ньюкасла. Показано, что природный тип белка E1A аденовируса взаимодействует с клеточными белками кровеносных сосудов и подавляет VEGF-сигнальный каскад (Saito, 2006). Вирус простого герпеса также ингибирует ангиогенный сигнал путем снижения экспрессии VEGF. Онколитический вирус осповакцины не только снижает уровень VEGF в период активной вирусной инфекции, но и подавляет повторную васкуляризацию после вирусной терапии. Кроме того есть предположения о наличии механизма, по которому осповакцина способна сенсibilизировать опухоли для ингибиторов тирозинкиназных рецепторов (Нои, 2014). Вирус везикулярного стоматита инициирует воспалительную реакцию с массовой инфильтрацией нейтрофилов, с дальнейшим образованием микросгустков в кровеносных сосудах, что приводит к потере перфузии и активации апоптоза опухоли в результате ишемии (Breitbach, 2011). Генетически-модифицированный вирус простого герпеса, несущий мышинный ген ангиостатина для снижения экспрессии VEGF, использовали в комплексной терапии с бевацизумабом при терапии опухоли мозга на модели глиом у бестимусных мышей, в результате чего удалось достигнуть усиления антиангиогенного эффекта и общей выживаемости (Zhang, 2012). Эксперимент *in vivo* с использованием реовируса 3-го типа штамм Dearing (REOLYSIN) дал возможность предположить, что внутриклеточный сигналинг VEGF-A₁₆₅-VEGFR-1/2 в эндотелиальных клетках опухоли создает благоприятные условия для активной вирусной репликации, аналогичные в Ras-активированных клетках опухоли, где вирус также активно размножается и реализует онколитические свойства (Kottke, 2010).

Экспериментальных примеров антиангиогенных свойств вируса болезни Ньюкасла описано не много. Тем не менее, в ряде работ было показано, что штаммы вируса болезни Ньюкасла способны подавлять ангиогенез. Эксперимент *in vitro* на опухолевых клетках глиобластомы показал, что спустя 18 часов после инфицирования клеток иракским штаммом вируса болезни

Ньюкасла можно отметить значительный антиангиогенный эффект по сравнению с необработанными вирусом контрольными клетками. Подавление ангиогенеза наблюдается в ингибировании экспрессии ангиогенных факторов таких, как FGF, KGF, VEGF и ICAM-1 (AL-Shammari, 2011; AL-Shammari, 2013). Таким образом, авторы предположили, что опухолевый узел может подвергаться ремиссии не только за счет прямого цитолитического эффекта инфицирования, но и путем ингибирования экспрессии опухолевыми клетками факторов ангиогенеза, которые индуцируют формирование кровеносных сосудов в опухоли.

Научная группа исследователей из Китая в результате эксперимента *in vivo* по исследованию цитолитической активности штамма ВБН на модели ксенографта человеческого рака желудка BGC-823 указала на наличие противоопухолевого действия ВБН через ингибирование ангиогенеза. Причем предполагается, что ангиостатический эффект связан со снижением числа CD31+-эндотелиальных клеток и ингибированием VEGF-A и MMP-2 в опухолевых клетках (Sui, 2017).

Кроме того, существует предположение, что гипоксия в опухолевой ткани, которая часто возникает при развитии опухоли, имеет благоприятные условия для вирусной репликации и реализации онколитических свойств. За последнее время в литературе было описано несколько онколитических вирусов таких, как вирус везикулярного стоматита или вирус энцефаломиокардита, которые способны не только активно реплицироваться в гипоксических условиях *in vitro*, но и имеют более высокую инфицирующую и репликативную способность в HIF-экспрессирующих клетках на модели *in vivo* (Connor, 2004; Roos, 2010).

С другой стороны имеются публикации, утверждающие о противоположном эффекте, когда при повышенной экспрессии HIF отмечается снижение эффекта от реализации VSV-опосредованного онколизиса (Hwang, 2006). Тем не менее, для вируса болезни Ньюкасла было показано, что гипоксия усиливает ВБН-опосредованный онколизис клеток рака почки человека для везикулярного висцеротропного штамма AF2240, выделенного в Малайзии (Ch'ng, 2013). При этом инфицирование ВБН сопровождается продукцией опухолевыми клетками ИФН-бета, но не ИФН-альфа, что важно для успешной репликации вируса, и кроме того продукция ИФН-бета способствует индукции клеточной гибели, путем апоптоза.

Так как терапевтический эффект многих ангиогенных ингибиторов ограничен, зачастую ведется поиск новых терапевтических подходов с использованием ангиогенной терапии. Комбинированное лечение с антиангиогенными соединениями и онколитическими вирусами может повысить эффективность противоопухолевых методов лечения.

1.6. Заключение по обзору литературы

Виротерапевтические методы лечения онкологических заболеваний относятся к быстро развивающемуся и перспективному направлению – таргетной медицине. Исследования биологических, вирусологических и генетических характеристик кандидатов на роль онколитических вирусов подтверждают противоопухолевый потенциал вирусов для лечения рака. Полученные обнадеживающие результаты пилотных работ по изучению противоопухолевых свойств вирусов в доклинических и клинических испытаниях диктуют необходимость дальнейших детальных исследований механизмов взаимодействия «вирус-клетка», приводящих к гибели опухолевых клеток.

Важным направлением в изучении вирусов с онколитическим потенциалом является идентификация принципиально новых штаммов, которые позволяют использовать природные непатогенные для человека изоляты в качестве противоопухолевого агента. В настоящее время существует множество исследовательских работ посвященных онколитическим вирусам, однако, большинство из них описывают результаты виротерпии рекомбинантными вирусными штаммами, в то время как природные изоляты представляют интерес для изучения их онколитических свойств.

Очевидно, что вирус болезни Ньюкасла, циркулирующий в популяции диких птиц, оказывается перспективным вариантом для исследования на наличие противоопухолевых свойств. Продемонстрировано, что ВБН, выделенный из природного резервуара, способен успешно убивать опухолевые клетки различной этиологии и гистогенеза. Современные методы исследования позволили не просто определить эффективность онколитического действия штаммов ВБН, но и изучить механизм вирус-опосредованной клеточной гибели и исследовать взаимодействие между вирусом и опухолевой клеткой, а также отследить влияние вируса на особенности активации иммунного ответа.

Кроме того, результаты исследований говорят о том, что природные штаммы ВБН могут служить основой для создания эффективного противоопухолевого препарата. Его цитотоксическое действие на опухолевых культурах клеток и безопасность для здоровых клеток демонстрирует эффективность в борьбе с раком. Изучение его противоопухолевой активности и механизмов противоопухолевого действия на лабораторных животных с привитыми опухолями дает представление о противоопухолевом потенциале и возможности проводить клинические испытания по онкотерапии на людях. Представления процессов избирательного цитотоксического действия, механизмов распространения и тропности вируса, способности влиять на ангиогенез в опухолевой ткани и иммунную систему имеет важное значение для разработки прототипного препарата на основе природного штамма ВБН.

Таким образом, целью данной работы является изучение 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*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (НИИЭКМ ФИЦ ФТМ). Проведение исследований на клеточных культурах и животных осуществлялось в отделе экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний НИИЭКМ ФИЦ ФТМ, морфологические исследования проводились в лаборатории структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний НИИЭКМ ФИЦ ФТМ, в Центре коллективного пользования «Современные оптические системы» НИИЭКМ ФИЦ ФТМ и на кафедре физиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ).

Реактивы и препараты

В работе использовали гепаринизированную кровь петуха для приготовления суспензии эритроцитов (питомник лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»); гентамицина сульфат 40 мг/мл (ОАО «Дальхимфарм», Россия), DAPI/Antifade Solution (Chemicon Int., США), CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Inc., США), полного адьюванта Фрейнда (Thermo Fisher Scientific, США), фермент RDE (Denka Seiken Co., Япония), параформальдегид (Sigma-Aldrich Inc., США), Тритон X100 (Sigma-Aldrich Inc., США), вторичное антитело Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor® 546 conjugate (Invitrogen, США), ДМСО (Thermo Fisher Scientific, США), Tween-80 (Sigma-Aldrich Inc., США), этиловый спирт, 10%-ный нейтральный забуференный формалин Блик (Блик Медикл Продакшн, Россия), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) (AppliChem, США), моноклональные антитела к CD34 (Abcam, Великобритания), моноклональные антитела к VEGFR-3 (Novocastra,) витрогель («БиоВитрум», Россия).

Растворы: Раствор натрия хлорида 0,9% (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), раствор Версена 0,02% («БиолоТ», Россия), раствор Хенкса (Gibco Inc., Великобритания), фосфатно-солевой буфер pH=7,2 (ФСБ) («БиолоТ», Россия), раствор Трипсина-Версена (1:1) («БиолоТ», Россия), раствор фиколла плотность 1,077 («БиолоТ», Россия). Для приготовления растворов использовали воду, очищенную на установке MilliQ (MilliPore, США).

Среды и сыворотки: Питательная среда для культур клеток Игла MEM с L-глутамином («БиолоТ», Россия), питательная среда для культур клеток RPMI-1640 с L-глутамином («БиолоТ», Россия), питательная среда для культур клеток ДМЕМ (Gibco Inc., Великобритания), питательная среда для культур клеток MEM (Gibco Inc., Великобритания), сыворотка плодов коров (Gibco Inc., Южная Америка).

Материалы

Пластиковые пробирки с резьбой и винтовой крышкой 2 мл (Ахуген, США), пластиковые пробирки 1,5 мл (Eppendorf, Германия), пластиковые наконечники с фильтром объемом 0,5-10 мкл, 5-200 мкл, 200-1000 мкл (Ахуген, США), серологические планшеты с V-образными лунками (TPP, Швейцария), 96-луночные культуральные планшеты (TPP, Швейцария), культуральные флаконы 25 см², 75 см² (TPP, Швейцария), фильтрующие шприцевые насадки 0,45 мкм, PVDF (JetBiofil, Китай), серологические пластиковые пипетки 5мл и 10 мл (TPP, Швейцария).

Оборудование

В работе использовали центрифугу «Eppendorf minispin plus» («Eppendorf», Германия), боксы микробиологической безопасности класс II тип A2 БМБ-II-«Ламинар-С.»-1,5 («Lamsystems», Россия), одноканальные и многоканальные лабораторные дозаторы переменного объема Ленпипет (Thermo Fisher Scientific, Россия), CO₂-инкубатор InnovaCO-170 (New Brunswick Scientific, США), инкубатор фермерский ИФХ-500 Н (ОмПО «Иртыш», Россия), овоскоп, ворттек (Biosan, Латвия), микропланшетный спектрофотометр Lonza Biotek ELX808 Absorbance Microplate Reader (Biotek, США), флуоресцентный микроскоп «AxioImager.M1» (ZEISS, Германия), лабораторный инвертированный микроскоп Axiovert 40 C (ZEISS, Германия), микроскоп AxioImagerA1 с фотокамерой AxioCamMRc и программным обеспечением AxioVision (rel. 4.12) (ZEISS, Германия), магнитно-резонансный томограф BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия). Для приготовления гистологических препаратов использовали аппарат для гистологической проводки MicromSTP-120 (Thermo Fisher Scientific, Германия), станция для заливки биологических тканей парафином MicromEC-350 (Thermo Fisher Scientific, Германия), моторизованный ротационный микротом MicromHM355 S (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Все оборудование, использовавшееся в настоящей работе, прошло метрическую проверку в соответствии с действующими правилами и нормативными документами.

Исследуемые инфекционные вирусные агенты

В качестве объектов исследований использовали 44 изолята вирусов болезни Ньюкасла из коллекции, сформированной в рамках проведения мониторинга вируса птичьего гриппа в пределах миграционных маршрутов диких птиц на территории Сибири и Дальнего Востока. Изоляты ВБН были выделены из клоакальных смывов и фрагментов кишечника, полученных от диких мигрирующих птиц, преимущественно отряда Гусеобразные. Птиц отлавливали общепринятыми методами с помощью паутиных 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). ВСЖ предварительно очистили через пористые фильтры 0,45 мкм и хранили при -80°C.

Наличие ВБН в аллантоисной жидкости определяли с помощью реакции гемагглютинации и методом ОТ-ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами. Вирусная РНК была выделена из ВСЖ. Первичную идентификацию 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 таблице 1 представлены исследуемые изоляты с указанием вида птиц, места и времени сбора проб и патотипа по результатам тестов МДТ и ИСРІ согласно общепринятым методам (Grimes, 2002; ОЕ, 2012). Все вирусологические исследования были выполнены на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (НИИЭКМ ФИЦ ФТМ).

Культуры клеточных линий

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 использовали следующие перевиваемые опухолевые клеточные линии человека: карцинома толстой кишки НСТ116+/, 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. Белгородцевым С.Н. (Клиника иммунопатологии НИИФКИ (Новосибирск, Россия)).

Опухолевые культуры клеток НСТ116, HELA и A549 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. Клеточную линию MCF7 культивировали в среде MEM 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 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 с 10%-ной сывороткой плодов коровы и 60 мкг/мл гентамицина сульфата при температуре 37°C и в атмосфере с 5% содержанием CO₂.

Работа с клеточными культурами выполнена на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (НИИЭКМ) и Института цитологии и генетики (ИЦиГ СО РАН).

Лабораторные животные и используемая опухолевая модель

В исследовательской практике широко используется постановка экспериментального онкогенеза на мышинной модели, что дает возможность переноса полученных данных на животных для человека. Мышиная модель является оптимальной для проведения экспериментов по изучению противоопухолевой активности онколитических штаммов ВБН при виротерапии опухоли и была выбрана для решения поставленных задач.

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. Возникшая изначально, как спонтанная опухоль молочной железы у гибридной мыши, была переведена в асцитную форму и на данный момент клетки Кребс-2 представляют малодифференцированные формы. Клетки линии Кребс-2 не содержат генов главного комплекса гистосовместимости, поэтому эффективно перевиваются в инбредных мышинных линиях. При внутримышечной прививке в область бедра образуется солидный узел. Метастазов опухоль не дает.

Работа с животными выполнена на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (НИИЭКМ) и Новосибирского государственного

университета (НГУ). Исследования на животных проводили в соответствии с Приложением к Приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Методы

Наработка пулов изолятов вируса болезни Ньюкасла

Для проведения исследований наличия онколитической активности ВБН изоляты вируса с известным титром РГА из коллекции были наработаны в нужном объеме на модели развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) путем заражения 9-10-дневных РКЭ в аллантоисную полость. Исходя из известного гемагглютинирующего титра, выбирали оптимальную дозу заражения РКЭ для каждого штамма вируса болезни Ньюкасла. Готовили необходимое разведение вируса на фосфатно-солевом буфере pH=7,2 («БиолоТ», Россия) и вносили в аллантоисную полость РКЭ в объеме 100 мкл разведения вируса на яйцо. Инфицированные РКЭ помещали в инкубатор с температурой 37°C. Ежедневно с помощью овоскопа проверяли жизнеспособность эмбрионов. На четвертые сутки РКЭ вскрывали и собирали вирус-содержащую аллантоисную жидкость.

Полученные стоки 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 на чувствительной линии клеток Vero, разливали в пробирки по 100 мкл. Хранение ВСЖ осуществляли при температуре - 80°C.

Выделение и идентификация вируса болезни Ньюкасла в аллантоисной жидкости

Наличие вируса в аллантоисной жидкости определяли в реакции гемагглютинации по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ (WHO, 2011).

1. Приготовление суспензии эритроцитов

Для постановки РГА использовали эритроциты петуха, для приготовления которых гепаринизированную кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1,200 об/мин на центрифуге «Eppendorf mini spinplus». Полученный супернатант и лейкоциты в верхнем слое осадка удаляли и эритроцитарный осадок промывали трижды ФСБ, ресуспендируя осадок с дальнейшим осаждением эритроцитов в течение 10 мин при 1,200 об/мин на центрифуге «Eppendorf mini spinplus». Количество эритроцитов в осадке определяли и разводили в ФСБ до необходимой концентрации. Конечная концентрация суспензии эритроцитов петуха составляет 0,5%.

2. Постановка и учет реакции гемагглютинации

В V-образном 96-луночном серологическом планшете готовили последовательные двукратные разведения тестируемой аллантоисной ВСЖ в 0,01 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,3 – 7,5 («БиолоТ»). Конечный объем ВСЖ в каждой лунке составлял 50 мкл. К полученным разведениям ВСЖ добавляли по 50 мкл стандартизированной суспензии эритроцитов петуха. Смесь перемешивали пипетированием. На каждом планшете ставили контроль эритроцитов (50 мкл ФСБ и 50 мкл суспензии эритроцитов петуха).

Приготовленную смесь затем инкубировали при 4°C без перемешивания. Спустя 30 мин проводили учет реакции после полного оседания эритроцитов в контрольных лунках. О наличии гемагглютинирующих агентов в образце ВСЖ судили по равномерной седиментации осадка эритроцитов на дне лунки. В этом случае РГА считали положительной. Наибольшее разведение ВСЖ, где РГА все еще была положительна, принимали за конечную точку титрования. Количество вируса болезни Ньюкасла, соответствующее конечной точке титрования, принимали за 1 гемагглютинирующую единицу (ГАЕ).

Титрование вируса болезни Ньюкасла в культуре клеток Vero

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/лунку. В качестве ростовой среды использовали питательную среду для культур клеток ДМЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки коров и раствора гентамицина сульфата в концентрации 60 мкг/мл. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение суток.

Готовили 10-кратные разведения имеющегося пула вируса на поддерживающей среде Игла-МЕМ с добавлением 1% фетальной сыворотки коров, начиная с разведения 10⁻¹. 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 CO₂-инкубаторе с температурой 37°C и подачей 5% CO₂ в течение 1 ч 30 мин для адсорбции вируса, затем содержимое лунок удаляли и вносили в каждую лунку по 200 мкл поддерживающей среды. Планшеты инкубировали в CO₂-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.

Инфекционный титр вируса для культуры клеток Vero рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в IgTCID₅₀/мл (Ашмарин, 1962).

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека (МНПК)

МНПК выделяли из гепаринизированной крови условно здорового донора в градиенте плотности фиколла при центрифугировании 30 мин при 1500 об/мин. Затем собирали образовавшееся интерфазное кольцо, содержащее МНПК и дважды отмывали в растворе Хенкса. Далее клетки ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 10% сыворотки плодов коровы и 60 мкг/мл гентамицина сульфата.

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, в основе которого лежит реакция восстановления соли тетразолия - 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) в живых клетках за счет митохондриальных дегидрогеназ в формазан, который формирует внутри клетки кристаллы. При последующем добавлении растворителя ДМСО кристаллы растворяются и по изменению оптической плотности окрашенных растворов делаются выводы о жизнеспособности клеток по отношению к контролю.

Для оценки цитопотического 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 (Gibco Inc.) 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-МЕМ («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 концентрации 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.

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 мышшиной 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-луночной 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). Этот реактив содержит соединение тетразолия MTS, которое в живых клетках, обладающих ферментативной активностью, восстанавливается до формазана, окрашивающего культуральную среду. 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.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток опухолевых линий человека.

1. Получение первичных поликлональных антител

Для получения первичных поликлональных антител нами была проведена иммунизация кроликов штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011. Раствор 2,5 мл очищенного центрифугированием вируса в 2,5 мл полного адьюванта Фрейнда вводили подкожно. 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, рН 7,3, 0,15М NaCl, 0,02% азида натрия. Исходная концентрация IgG 6,6 мг/мл.

2. 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 8 ГАЕ/10, 000 клеток штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011.

Опухолевые клетки инкубировали с вирусом в дозе 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 ВБН, 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 0,1 мкг/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 виротерапии *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 был наработан в аллантоисной жидкости РКЭ, крупный дебрис удалили центрифугированием на низких оборотах 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 аллантоисной жидкости неинфицированных РКЭ, прошедшей центрифугирование и через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Доза вирусных инъекций, схема виротерапии и введения аллантоисной жидкости, объем инъекций и условия содержания животных полностью аналогичны условиям первого эксперимента. Животных ежедневно взвешивали. Динамику роста опухоли оценивали, проводя ежедневные замеры пораженной 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.

Оценка острой токсичности при внутривенном введении вируса

Изучение острой токсичности вирус-содержащей жидкости при внутривенном введении проводилось согласно методическим рекомендациям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств», утвержденным Министерством здравоохранения и социального развития РФ и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России (Миронов, 2012). Острая токсичность исследовали на 30-ти самцах мышей линии BALB/c, одного возраста, весом 18-20 граммов, разделенных на две группы (контрольная и экспериментальная) по 15 животных в каждой, находившихся на стандартной диете в идентичных условиях вивария (предварительный карантин 14 дней). Острая токсичность определялась после однократного внутривенного введения

в хвостовую вену стерильным шприцем 6,7 IgTCID50 в объеме 500 мкл инфицирующей жидкости (экспериментальная группа) и физиологического раствора (контрольная группа) в объеме 500 мкл. Наблюдение за животными осуществлялось непрерывно, по меньшей мере, в течение первых 60 минут после введения дозы, затем периодически в течение 24 часов (уделяя особое внимание первым 8 часам), и далее ежедневно, в общей сложности на протяжении 14 дней, за исключением случаев, когда животные выводили из эксперимента для гистологических исследований и титрования гомогенатов органов для оценки наличия вируса в тканях. В течение наблюдения фиксировали показатели, характеризующие токсическое действие - общее состояние животных, особенности поведения, двигательной и дыхательной активности, состояние шерстяного и кожного покровов и слизистых оболочек, потребление корма и воды, изменение массы тела.

Животных обеих групп использовали для исследования влияния вируса болезни Ньюкасла на нормальные ткани организма при однократном внутривенном введении.

Морфологические методы, используемые в работе.

Гистологическое исследование

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 MicromHM355 S (Thermo Fisher Scientific, Германия). Депарафинированные срезы окрашивали по стандартной методике гематоксилин-эозином для получения обзорной окраски и заключали в монтирующую среду Витрогель. Полученные окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа AxioImagerA1 с фотокамерой AxioCamMRc и программным обеспечением AxioVision (rel. 4.12) (ZEISS, Германия).

Иммуногистохимическое исследование

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 исследовали при увеличении микроскопа 20, 40, 63 раз. При морфометрическом исследовании оценивали степень структурных изменений опухолевой ткани, учитывая объемную плотность некрозов (V_v), численную плотность сосудов микроциркуляторного русла (N_{ai}).

Исследование влияния вируса болезни Ньюкасла на нормальные ткани организма при однократном внутривенном введении

Для проверки наличия вируса в нормальных клетках организма и анализа степени структурных изменений тканей здоровых органов под действием вируса проводили исследование внутренних органов мышей линии BALB/c после однократной внутривенной инъекции вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 в хвостовую вену стерильным шприцем в дозе 6,7 lgTCID₅₀ в 500 мкл инфицирующей жидкости. На 1-е, 3-е и 5-е сутки после введения ВБН животным из экспериментальной и контрольной (получавшей внутривенно физиологический раствор в 500 мкл) группы выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков (по 3 мыши на точку). Проводили забор органов (селезенка, печень, почки и легкое). Часть извлеченных органов шла на приготовление гомогенатов для вирусологических исследований (ОТ-ПЦР и TCID₅₀).

Из полученных органов готовили гомогенаты на физиологическом растворе для проверки наличия ВБН 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). Репликативную активность вируса в органах инфицированных мышей определяли титрованием гомогената на культуре клеток Vero по методике описанной выше и при заражении полученной инфицирующей жидкости из гомогената РКЭ.

Оставшиеся кусочки органов изучали при гистологических исследованиях (световая микроскопия, иммуногистохимический анализ). В качестве первичных антител использовали поликлональные антитела, наработанные на кроликах после иммунизации штаммом вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011.

Реакция секвенирования

Выделение РНК. Суммарная РНК была выделена из 250 мкл аллантоиса с использованием реагента TRIzolLS (Invitrogen, США) Концентрацию РНК измеряли с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen, США).

Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование. Для получения кДНК 50 нг РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы с гексапраймером при 85 °С в течении 5 мин., после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAidPremium (Thermo Scientific, США) и 20 ед. ингибитора РНаз RNasin (Promega, США). Инкубировали при 25°С 10 мин, далее при 42 °С 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 70°С 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с использованием набора «NEBNext®mRNASecondStrandSynthesisModule» (NEB, США) в соответствии с инструкцией. Полученную дцДНК очищали с использованием набора «MinElute PCR PurificationKit» (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAcube. Для получения ДНК библиотек из дцДНК использовали набор «TruSeq DNA SamplePrepKits v2» (Illumina, США) в соответствии с инструкцией. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза «QIAxcel AdvancedSystem» (QIAGEN, Германия). Измерение молярности полученных библиотек проводили методом ПЦР в реальном времени (2x SsoFastEvaGreenSupermix (Bio-Rad, США), прибор Bio-RadCFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве «SequencingLibraryqPCRQuantificationGuide» (Illumina, США). Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора «MiSeqReagentKits V2 (300PE)» в соответствии с инструкцией производителя.

Биоинформационный анализ. Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов проводили с использованием программы «CLCGenomicsWorkbench 5.5» (CLC bio, США).

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка 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».

Таблица 1. Изоляты вируса болезни Ньюкасла, выделенные на территории Российской Федерации в период с 2008 по 2014 гг.

№	Изолят ВБН	Место сбора проб	Вид	Патотип*
2008				
1	NDV/Altai/garganey/49/2008	Алтайский край	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	Л
2	NDV/Altai/gadwall/66/2008	Алтайский край	Утка серая (<i>Anas strepera</i>)	Л
3	NDV/Amur/grasswarbler/267/2008	Амурская область	Певчий сверчок (<i>Locustella certhiola</i>)	Л
4	NDV/Novosibirsk/mallard/718/2008	Новосибирская область	Кряква (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Л
5	NDV/Novosibirsk/shoveler/738/2010	Новосибирская область	Широконоска (<i>Anas clypeata</i>)	Л
6	NDV/Novosibirsk/garganey/753/2008	Новосибирская область	Чирок-свиистунок (<i>Anas crecca</i>)	Л
7	NDV/Novosibirsk/garganey/767/2008	Новосибирская область	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	Л
8	NDV/Novosibirsk/garganey/769/2008	Новосибирская область	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	Л
9	NDV/Adygea/duck/12/2008	Республика Адыгея	Утка серая (<i>Anas strepera</i>)	В
10	NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2008	Новосибирская область	Широконоска (<i>Anas clypeata</i>)	Л
2009				
11	NDV/Altai/garganey/564/2009	Алтайский край	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	Л
12	NDV/mallard/Amur/264/2009	Амурская область	Кряква (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Л
13	NDV/Kamchatka/gull/12/2009	Камчатский край	Сизая чайка (<i>Larus canus</i>)	Л
14	NDV/Kamchatka/gull/528/2009	Камчатский край	Тихоокеанская чайка (<i>Larus schistisagus</i>)	Л
15	NDV/Novosibirsk/garganey/428/2010	Новосибирская область	Широконоска (<i>Anas clypeata</i>)	Л
16	NDV/Novosibirsk/shoveler/429/2010	Новосибирская область	Широконоска (<i>Anas clypeata</i>)	Л
17	NDV/Novosibirsk/garganey/452/2009	Новосибирская область	Чирок-свиистунок (<i>Anas crecca</i>)	Л
18	NDV/Novosibirsk/garganey/465/2009	Новосибирская область	Чирок-свиистунок (<i>Anas crecca</i>)	Л
19	NDV/Novosibirsk/goosander/529/2009	Новосибирская область	Большой крохаль (<i>Mergus merganser</i>)	Л
20	NDV/Novosibirsk/garganey/746/2009	Новосибирская область	Чирок-свиистунок (<i>Anas crecca</i>)	Л
21	NDV/Novosibirsk/mallard/4112/2009	Новосибирская область	Кряква (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Л
22	NDV/Yakutiya/mallard/860/2009	Республика Саха (Якутия)	Кряква (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Л

2010				
23	NDV/Altai/pigeon/777/2010	Алтайский край	Сизый голубь (<i>Columba livia</i>)	М
24	NDV/Altai/mallard/784/2010	Алтайский край	Кряква (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Л
25	NDV/Amur/garganey/922/2010	Амурская область	Чирок-клоктун (<i>Anas formosa</i>)	Л
26	NDV/Amur/dove/992/2010	Амурская область	Большая горлица (<i>Streptopelia orientalis</i>)	Л
27	NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010	Новосибирская область	Чирок-свистунук (<i>Anas crecca</i>)	Л
28	NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010	Новосибирская область	Чирок-свистунук (<i>Anas crecca</i>)	Л
29	NDV/Novosibirsk/garganey/322/2010	Новосибирская область	Чирок-свистунук (<i>Anas crecca</i>)	Л
30	NDV/Novosibirsk/garganey/329/2010	Новосибирская область	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	Л
31	NDV/Novosibirsk/garganey/339/2010	Новосибирская область	Чирок-свистунук (<i>Anas crecca</i>)	Л
32	NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010	Новосибирская область	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	Л
33	NDV/Novosibirsk/garganey/389/2010	Новосибирская область	Чирок-свистунук (<i>Anas crecca</i>)	Л
34	NDV/Novosibirsk/shoveler/396/2010	Новосибирская область	Широконоска (<i>Anas clypeata</i>)	Л
35	NDV/Novosibirsk/gadwall/703/2010	Новосибирская область	Утка серая (<i>Anas strepera</i>)	Л
36	NDV/Novosibirsk/shoveler/945/2010	Новосибирская область	Широконоска (<i>Anas clypeata</i>)	Л
37	NDV/Sakhalin/pintail/47/2010	Сахалинская область	Шилохвость (<i>Anas acuta</i>)	Л
38	NDV/Sakhalin/widgeon/48/2010	Сахалинская область	Связь (<i>Anas penelope</i>)	Л
39	NDV/Sakhalin/garganey/52/2010	Сахалинская область	Чирок-свистунук (<i>Anas crecca</i>)	Л
40	NDV/Sakhalin/pintail/53/2010	Сахалинская область	Шилохвость (<i>Anas acuta</i>)	Л
2011				
41	NDV/Altai/pigeon/770/2011	Алтайский край	Сизый голубь (<i>Columba livia</i>)	М
42	NDV/Yakutiya/mallard/852/2011	Республика Саха (Якутия)	Кряква (<i>Anas platyrhynchos</i>)	М
2014				
43	NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014	Новосибирская область	Чирок-трескунок (<i>Anas querquedula</i>)	Л
44	NDV/Tyva/gull/14/2014	Республика Тыва	Сизая чайка (<i>Larus canus</i>)	Л

* - Л: лентогенный, М: мезогенный, В: велогенный патотип по результатам тестом MDT и ICPI.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам совместных работ сотрудников кафедры физиологии НГУ и сотрудников отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний НИИЭКМ ФИЦ ФТМ в рамках проведения мониторинга вируса гриппа за период с 2008 по 2014 год были собраны клоакальные смывы и фрагменты кишечника от диких птиц преимущественно на территории Сибири и Дальнего Востока. Из обследованного биологического материала вирус болезни Ньюкасла был выделен от птиц на территории восьми административных регионов РФ: Алтайский край, Новосибирская область (Западная Сибирь), Республика Тыва (Восточная Сибирь) и Амурская область, Камчатский край, Республика Саха (Якутия), Сахалинская область (Дальний Восток) и один штамм выделен на территории Республики Адыгея (Южный федеральный округ). По результатам работ была сформирована коллекция из 44 штаммов ВБН, выделенных от диких мигрирующих птиц преимущественно на территории Сибири и Дальнего Востока Российской Федерации в период 2008-2014 гг.

3.1. Выбор системы наработки и подготовка препаративного количества штаммов вируса болезни Ньюкасла.

В качестве стоковых изолятов были взяты исходные коллекционные природные штаммы, представляющие собой урожай первого пассажа на развивающихся куриных эмбрионах. Первичная идентификация изолированных вирусов болезни Ньюкасла осуществлялась 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).

Для получения рабочего объема вирусного материала каждого из 44 природных изолятов ВБН для последующих исследований онколитических свойств штаммов из имеющейся коллекции использовали две системы наработки вируса. Первая система наработки вируса заключалась в однократном пассировании штаммов ВБН на культуре клеток Vero, в результате чего были собраны препаративные количества вирус-содержащей культуральной среды на основе питательной среды МЕМ («Биолот») с 1% ФБС. Во второй системе необходимый объем вируса был получен после наработки в аллантоисной полости РКЭ. Таким образом, получили два варианта вирусных штаммов – штаммы, прошедшие один пассаж на РКЭ и один пассаж на клеточной культуре Vero, и штаммы, прошедшие два пассажа на 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 2).

Таблица 2. Титр изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных на территории Российской Федерации в период с 2008 по 2014 гг., по реакции гемагглютинации (РГА).

№	Изолят ВБН	Титр РГА* в системе РКЭ	Титр РГА* в системе Vero
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
7	NDV/Novosibirsk/garganey/767/2008	16	4
8	NDV/Novosibirsk/garganey/769/2008	256	16
9	NDV/Adygea/duck/12/2008	256	16
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
23	NDV/Altai/pigeon/777/2010	128	16
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
28	NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010	128	8
29	NDV/Novosibirsk/garganey/322/2010	8	< 2
30	NDV/Novosibirsk/garganey/329/2010	128	8
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
41	NDV/Altai/pigeon/770/2011	128	16
42	NDV/Yakutiya/mallard/852/2011	128	16
43	NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014	128	8
44	NDV/Tyva/gull/14/2014	128	8

*- значения титра РГА выражены в гемагглютинирующих единицах в 50 мкл ВСЖ (ГАЕ/50 мкл).

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.

Из литературных данных известно, что в последние десятилетия наблюдается тенденция использования чувствительных клеточных культур для наработки вируса при производстве вакцин и прототипных лекарственных препаратов (Ungerechts, 2016). При этом тенденция обуславливается повышенным спросом производства большого объема вакцин, в том числе и противогриппозных (Song, 2016) – в случае вируса гриппа полученный в клеточных культурах вирус, имеет высокое сходство с циркулирующими штаммам, в отличие от вируса, полученного на РКЭ, которые могут иметь антигенные модификации (Matthews, 2006). Однако вирус болезни Ньюкасла несет более стабильный оц(-)РНК геном в отличие от сегментированного генома вируса гриппа, который обеспечивает высокую изменчивость вируса вследствие рекомбинации и reassortации (Соболев, 2016). Помимо этого система РКЭ остается широко используемым и легкодоступным методом для наработки вирусов, и кроме всего идеальным высокотропным субстратом для репликации ВБН. Кроме того развивающиеся куриные эмбрионы и клеточные культуры, полученные из них, остаются основной системой наработки вируса при производстве целого ряда человеческих вакцин (WHO, 2018b).

Стоит отметить, что тенденция смены системы РКЭ в качестве субстрата при подготовке вирус-содержащих вакцин на использование клеточных модельных культур, связана в большей степени с опасениями фармкомпаний относительно возможного присутствия овальбумина в вакцинных препаратах, на который у пациентов с аллергией на яичный белок может развиваться аллергическая реакция с осложнениями со стороны сердечно-сосудистой и респираторной систем организма. Однако результаты ряда исследований по оценке возможного влияния овальбумина были подробно описаны при исследовании компонентов вакцин против гриппа и против желтой лихорадки, которые готовят на РКЭ, а также при исследовании MMRV-вакцин (корь, паротит,

краснуха и ветряная оспа) и вакцины против бешенства, которые готовят на фибробластах, выделенных из РКЭ и несущих следовые количества овальбумина, – есть данные, что количество яичного белка в отдельных коммерческих препаратах слишком мало, чтобы вызвать аллергическую реакцию; что вакцинация людей с аллергией на яичный белок только в крайне редких случаях проходит с проявлением в течение 30 минут после введения препарата аллергических реакций в мягкой форме в виде ринита, крапивницы и кожного зуда; что тяжелые системные аллергические реакции у людей с аллергией на овальбумин не наблюдаются после введения вакцин, содержащих яичный белок в составе (Dobardzic, 2007; Grohskopf, 2016; McLean, 2013; Rutkowski, 2013). Кроме того, аллергические реакции вплоть до анафилактического шока, могут вызывать другие различные компоненты вакцин у чувствительных к этим компонентам пациентов, в том числе среди таких составляющих числятся желатин или неомицин, присутствующие в составе препаратов (Dobardzic, 2007; Chung, 2014). Подобные реакции достаточно редки, и, как правило, пациенты знают о своих противопоказаниях и должны уведомить о них лечащий персонал.

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.

Также в ряде работ показано, что титр ВБН выше при наработке в системе РКЭ. При этом повышение эффективности репликации вируса в культуре можно добиться путем использования дополнительных методик – например, выращивание клеток на коммерческих препаратах микроносителей и путем адаптации штамма к клеточной линии (Arifin, 2010). В процессе адаптации вирусов могут возникать варианты, способные к более эффективному размножению в клетках-хозяевах, чем исходный вирус дикого типа. С одной стороны, адаптация вируса к конкретной клеточной линии может приводить к усилению цитотоксического потенциала адаптированного вируса на этих клетках (Kumar, 2012). Однако, как правило, при увеличении инфекционности вируса к адаптированным клеткам параллельно наблюдается снижение вирулентности (Ahamed, 2004; Visnuvinayagam, 2015), что, вероятно, может отрицательно сказаться на онколитических свойствах исследуемых штаммов ВБН.

Кроме того, наработка вируса в первом пассаже на выбранной системе РКЭ препятствует возможной изменчивости свойств вирусов в результате адаптации и аттенуации при многократных культивированиях штаммов в аллантаисной оболочке РКЭ, многократных пассажей на чувствительной клеточной культуре Vero *in vitro* или на опухолевых клеточных культурах человека или животных.

Исходя из полученных результатов, выбор системы для наработки штаммов вируса болезни Ньюкасла в необходимых объемах для использования в последующих экспериментах обусловлен высокой репликативной активностью ВБН в аллантаисной полости куриных эмбрионов, что позволяет за сравнительно короткий период времени и один пассаж наработать достаточный объем вируса в высоких титрах. Каждый штамм был наработан в объеме 10 мл вирус-содержащей аллантаисной жидкости, которая была очищена через пористые фильтры.

3.2. Оценка инфекционного титра штаммов вируса болезни Ньюкасла.

Для всех природных штаммов определен инфекционный титр TCID₅₀ на культуре клеток Vero. Выбор клеточной линии обусловлен чувствительностью клеток Vero к вирусу болезни Ньюкасла за счет отсутствия способности клеток в ответ на заражение вирусом секретировать альфа- и бетта-интерферон, к воздействию которых показана чувствительность штаммов ВБН.

Для двенадцати 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 3, проанализированные штаммы агглютинируют эритроциты петуха в близких титрах, причем максимальные различия титров в РГА отличаются не более чем в 2 раза.

Таблица 3. Инфекционный титр природных изолятов вируса болезни Ньюкасла, определенный на культуре Vero в тканевой цитопатической дозе, и титр в реакции гемагглютинации.

Изолят ВБН	Титр в РГА, ГАЕ/50мкл [*]	Значение lgTCID ₅₀ /мл±2σ [#]
NDV/Novosibirsk/garganey/753/2008	128	4,4±0,29
NDV/Adygea/duck/12/2008	256	3,0±0,26
NDV/Yakutiya/mallard/860/2009	256	4,1±0,32
NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010	256	3,9±0,28
NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010	128	3,5±0,34
NDV/Novosibirsk/garganey/329/2010	128	3,5±0,36
NDV/Altai/pigeon/777/2010	128	6,0±0,35
NDV/Sakhalin/pintail/53/2010	256	3,4±0,31
NDV/Altai/pigeon/770/2011	128	7,2±0,49
NDV/Yakutiya/mallard/852/2011	256	5,9±0,33
NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014	128	5,3±0,42
NDV/Tyva/gull/14/2014	128	4,5±0,44

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

Первые изменения монослоя чувствительной клеточной культуры Vero при заражении штаммами вируса болезни Ньюкасла, проявлявших цитопатический эффект, наблюдаются на 2-е 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 6).

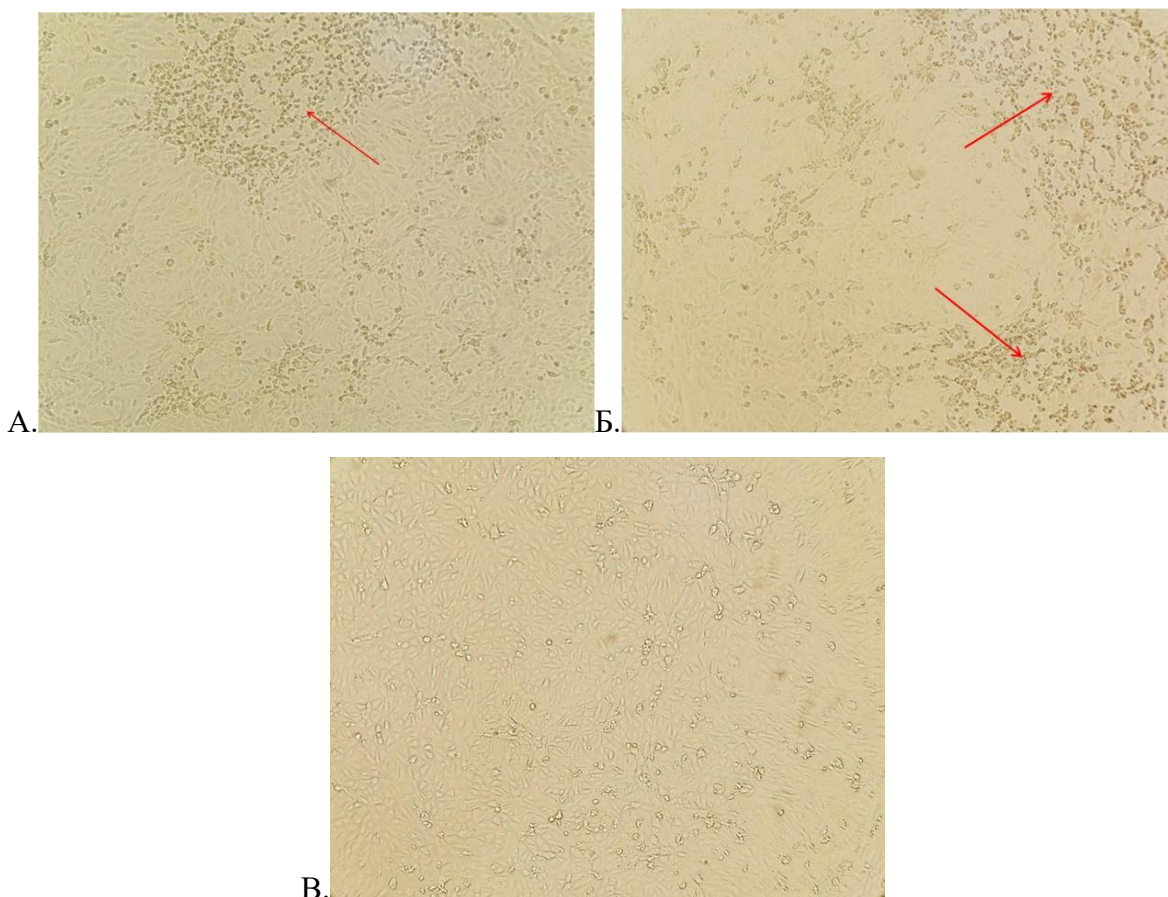


Рисунок 6. Светооптическое исследование морфологических изменений в клеточной культуре Vero, инфицированной вирусом болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011. Начало формирования очагов ЦПД. А. Разведение вируса $10^{(-2)}$. Б. Разведение вируса $10^{(-1)}$. 36 часов после заражения разведениями вируса. Увеличение 10х. В. 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 8-10) по сравнению с контрольными клетками (Рисунок 7). При этом клетки разрушаются и вирус высвобождается в среду.

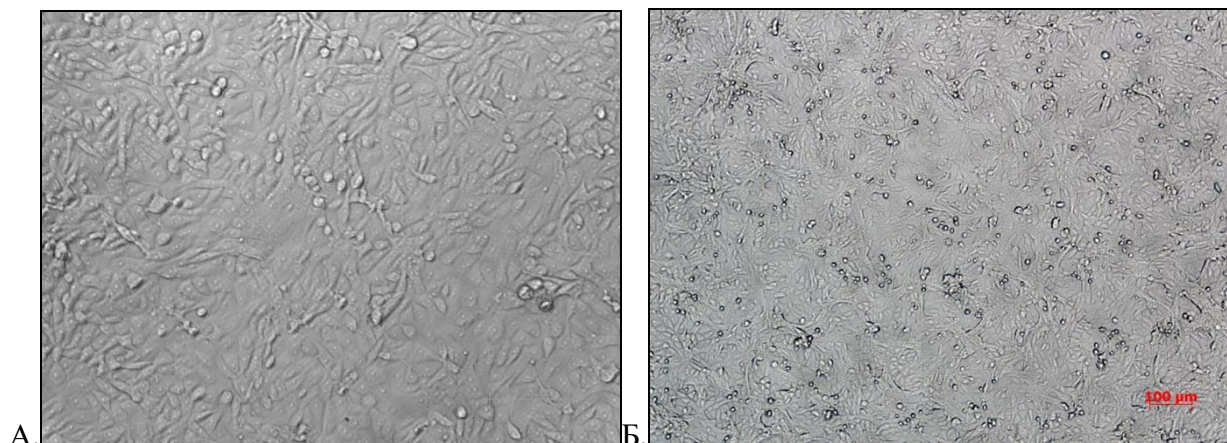


Рисунок 7. Светооптическое исследование морфологических изменений в контрольной клеточной культуре Vero, не инфицированной вирусом болезни Ньюкасла. 3-е сутки эксперимента. Увеличение 20х (А), увеличение 10х (Б).

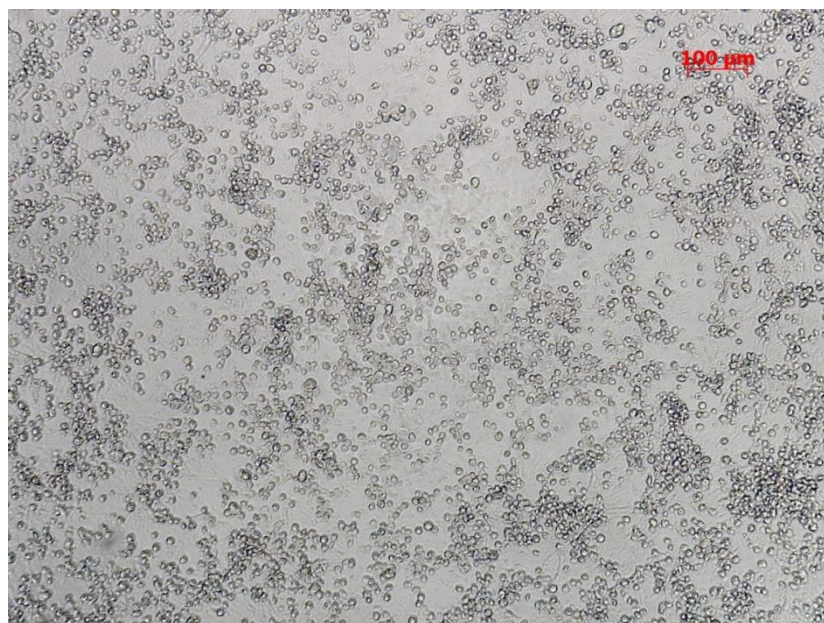


Рисунок 8. Светооптическое исследование морфологических изменений в клеточной культуре Vero, инфицированной штаммом вирусом болезни Ньюкасла NDV/Yakutiya/mallard/852/2011. 3 сутки эксперимента, разведение вируса 10^{-4} . Увеличение 10х.

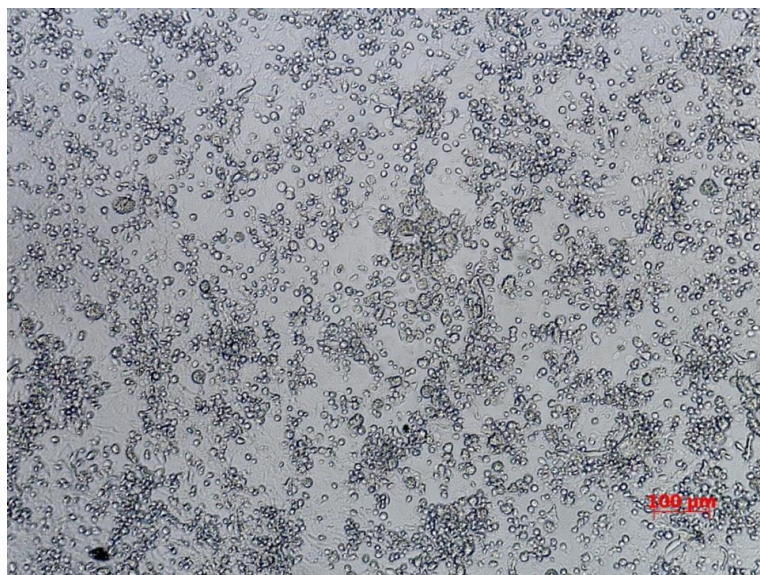


Рисунок 9. Светооптическое исследование морфологических изменений в клеточной культуре Vero, инфицированной штаммом вирусом болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011. 3-е сутки эксперимента, разведение вируса 10^{-4} . Увеличение 10х.

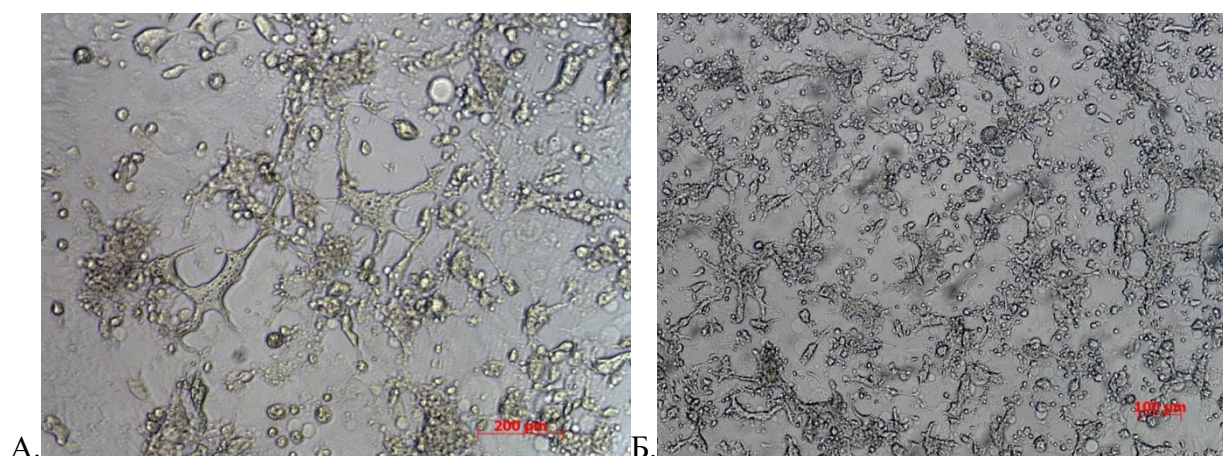


Рисунок 10. Светооптическое исследование морфологических изменений в клеточной культуре Vero, инфицированной штаммом вирусом болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011. Слияние погибших клеток. 3-е сутки эксперимента, разведение вируса 10^{-3} . Увеличение 20х (А). Увеличение 10х (Б).

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 10).

Инфекционный титр IgTCID₅₀/мл на светооптическом уровне не удалось определить у 32 штаммов из коллекции. На третьи сутки эксперимента клеточный монослой Vero, зараженный этими штаммами, не отличается по морфологии от контрольных клеток (Рисунок 7 и Рисунок 11). 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.

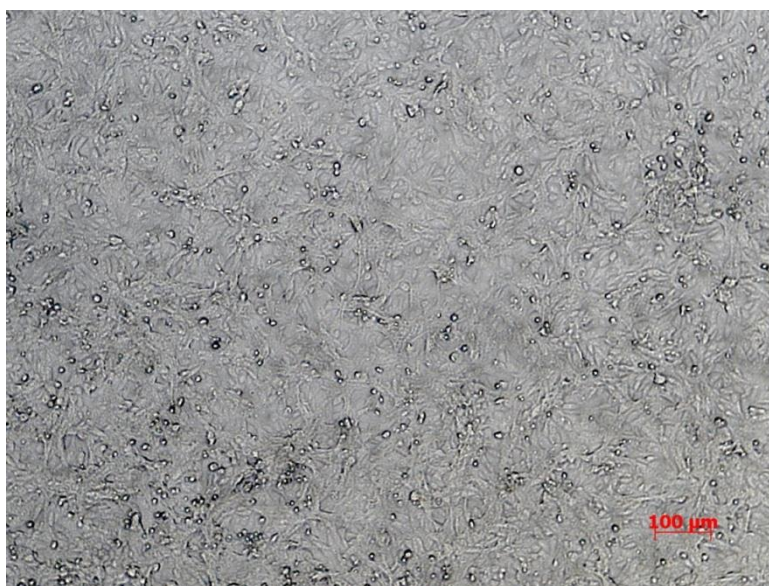


Рисунок 11. Светооптическое исследование морфологических изменений в клеточной культуре Vero, инфицированной штаммом вирусом болезни Ньюкасла NDV/Novosibirsk/garganey/769/2008. 3-е сутки эксперимента, разведение вируса 10^{-2} . Увеличение 10х.

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 удастся 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 изолятов в коллекции получили 28 изолятов, которые использовали в данной работе (Таблица 4).

Таблица 4. Изоляты вируса болезни Ньюкасла, выбранные из коллекции штаммов ВБН для оценки наличия онколитических свойств на опухолевых клеточных линиях человека *in vitro*. Исследуемые изоляты вируса болезни Ньюкасла.

Штамм	Титр РГА*	место сбора проб	год сбора проб
NDV/Altai/garganey/49/2008	32	Алтайский край	2008
NDV/Novosibirsk/mallard/718/2008	256	Новосибирская область	2008
NDV/Novosibirsk/garganey/753/2008	128	Новосибирская область	2008
NDV/Novosibirsk/garganey/769/2008	256	Новосибирская область	2008
NDV/Adygea/duck/12/2008	256	Республика Адыгея	2008
NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2010	256	Новосибирская область	2008
NDV/mallard/Amur/264/2009	256	Амурская область	2009
NDV/Kamchatka/gull/12/2009	128	Камчатский край	2009
NDV/Novosibirsk/shoveler/429/2010	64	Новосибирская область	2009
NDV/Novosibirsk/garganey/465/2009	32	Новосибирская область	2009
NDV/Novosibirsk/garganey/746/2009	32	Новосибирская область	2009
NDV/Yakutiya/mallard/860/2009	256	Республика Саха (Якутия)	2009
NDV/Altai/pigeon/777/2010	128	Алтайский край	2010

NDV/Amur/garganey/922/2010	64	Амурская область	2010
NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010	256	Новосибирская область	2010
NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010	128	Новосибирская область	2010
NDV/Novosibirsk/garganey/329/2010	128	Новосибирская область	2010
NDV/Novosibirsk/garganey/339/2010	128	Новосибирская область	2010
NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010	32	Новосибирская область	2010
NDV/Novosibirsk/garganey/389/2010	128	Новосибирская область	2010
NDV/Novosibirsk/shoveler/945/2010	32	Новосибирская область	2010
NDV/Sakhalin/widgeon/48/2010	32	Сахалинский край	2010
NDV/Sakhalin/garganey/52/2010	32	Сахалинский край	2010
NDV/Sakhalin/pintail/53/2010	256	Сахалинский край	2010
NDV/Altai/pigeon/770/2011	256	Алтайский край	2011
NDV/Yakutiya/mallard/852/2011	128	Республика Саха (Якутия)	2011
NDV/Novosibirsk/garganey/27/2014	128	Новосибирская область	2014
NDV/Tyva/gull/14/2014	128	Республика Тыва	2014

* - Значения титра РГА выражены в гемагглютинирующих единицах в 50 мкл ВСЖ (ГАЕ/50 мкл).

3.3. 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. Принцип метода основан на способности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы переводить водорастворимую желтую соль МТТ в фиолетовые кристаллы формазана, которые накапливаются в цитоплазме клеток. Об уровне интенсивности накопления этих кристаллов можно судить о жизнеспособности клеток в клеточном монослое.

Объектами исследования цитотоксичности природных штаммов ВБН служили опухолевые клеточные линии человека A549, MCF7, HeLa и HCT116. МТТ-тест ставили на четвертые сутки после инфицирования клеточного монослоя разведениями вируса. Клетки высаживали на планшет и через сутки монослоем 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). Результаты МТТ-теста

представлены на рисунке 12 для культуры НСТ116, на рисунке 14 для культуры HeLa, на рисунке 16 для культуры A549 и на рисунке 18 для культуры MCF7.

МТТ-тест дает представление о метаболической активности исследуемых клеток, что позволяет дать оценку о специфической гибели клеток после инфицирования вирусом. Результаты оценки жизнеспособности клеток опухолевых линий представлены в виде гистограмм в процентах как средние относительные значения доли живых клеток на четвертые сутки после обработки штаммами вируса к доли контрольных не обработанных вирусом клеток с учетом стандартного отклонения (среднее относительное значение \pm стандартное отклонение).

3.3.1. Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВВН на линии клеток карциномы толстой кишки НСТ116

Как следует из данных рисунка 12, 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 ВВН, 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% \pm 4,60% жизнеспособных клеток, NDV/Altai/pigeon/770/2011 – 37,80% \pm 3,85% жизнеспособных опухолевых клеток и NDV/teal/Novosibirsk region/320/2010 - 43,46% \pm 5,65% клеток на четвертые сутки после инфицирования вирусом в дозе 16 ГАЕ/10,000 клеток (Рисунок 13). Онколитический эффект остальных штаммов относительно клеток НСТ116 оказался менее выраженным, так как жизнеспособность данной клеточной линии составила порядка 50-60%: NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010 – 54,18% \pm 6,12%, NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010 – 58,20% \pm 2,14%, NDV/mallard/Amur/264/2009 – 58,34% \pm 4,36% и NDV/Novosibirsk/shoveler/776/2010 – 62,24% \pm 5,96% жизнеспособных опухолевых клеток на четвертые сутки после инфицирования вирусом в дозе 16 ГАЕ/10,000 клеток (Рисунок 13).

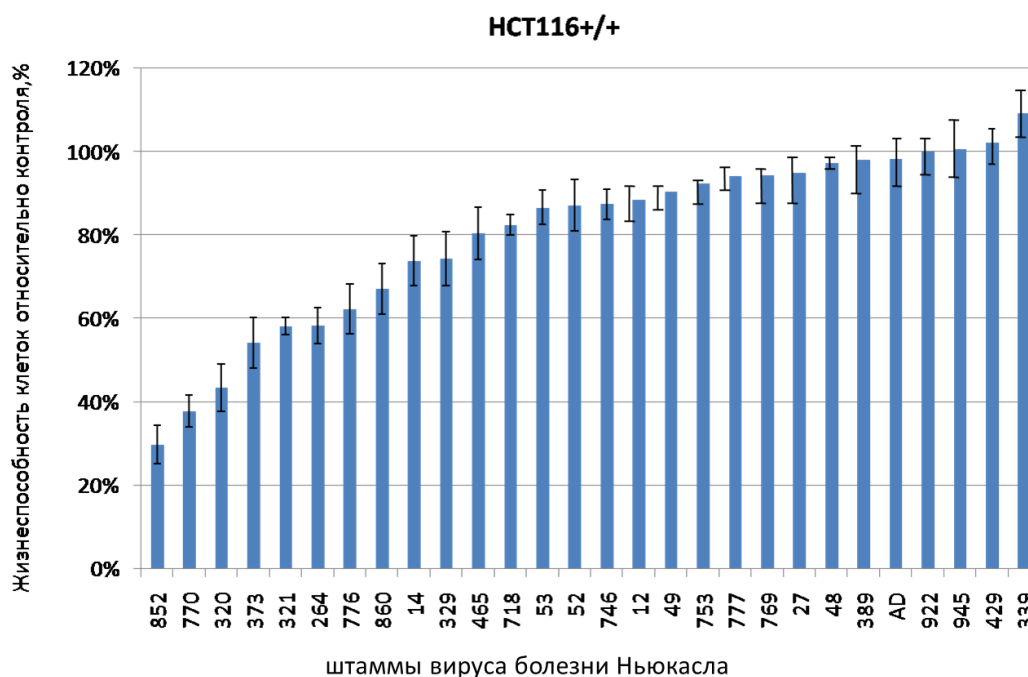


Рисунок 12. Жизнеспособность опухолевой клеточной культуры НСТ116 после экспозиции со штаммами ВБН, 4-е сутки инкубации. Результаты контроля – клеток НСТ116, инкубированных со средой, приняты за 100%, результаты МТТ-теста.

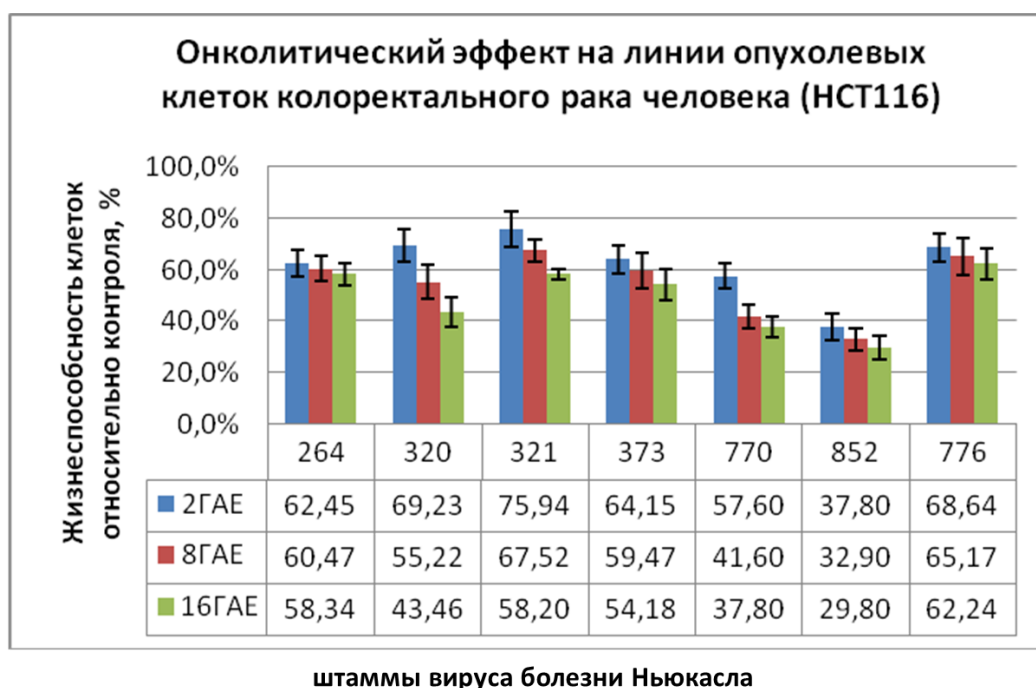


Рисунок 13. Онколитический эффект штаммов ВБН на перевиваемой линии опухолевых клеток колоректального рака человека (НСТ116) в системе *in vitro* на четвертые сутки после инфицирования вирусом (дозы 2, 8 и 16 ГАЕ/10,000 клеток), МТТ-анализ.

3.3.2. Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток эпидермоидной карциномы рака шейки матки HeLa

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

Наиболее выраженный онколитический потенциал на данной линии клеток (менее 30% жизнеспособных клеток на четвертые сутки после инфицирования вирусом в дозе 16 ГАЕ/10,000 клеток) наблюдается для NDV/Altai/pigeon/777/2010 – $17,17\% \pm 2,36\%$, NDV/Altai/pigeon/770/2011 – $21,71\% \pm 2,10\%$, NDV/mallard/Amur/264/2009 – $22,45\% \pm 2,19\%$, NDV/Novosibirsk/garganey/373/2010 – $22,58\% \pm 2,12\%$, NDV/Novosibirsk/garganey/321/2010 – $24,42\% \pm 4,32\%$, NDV/Yakutiya/mallard/860/2009 – $25,79\% \pm 2,70\%$ (Рисунок 15).

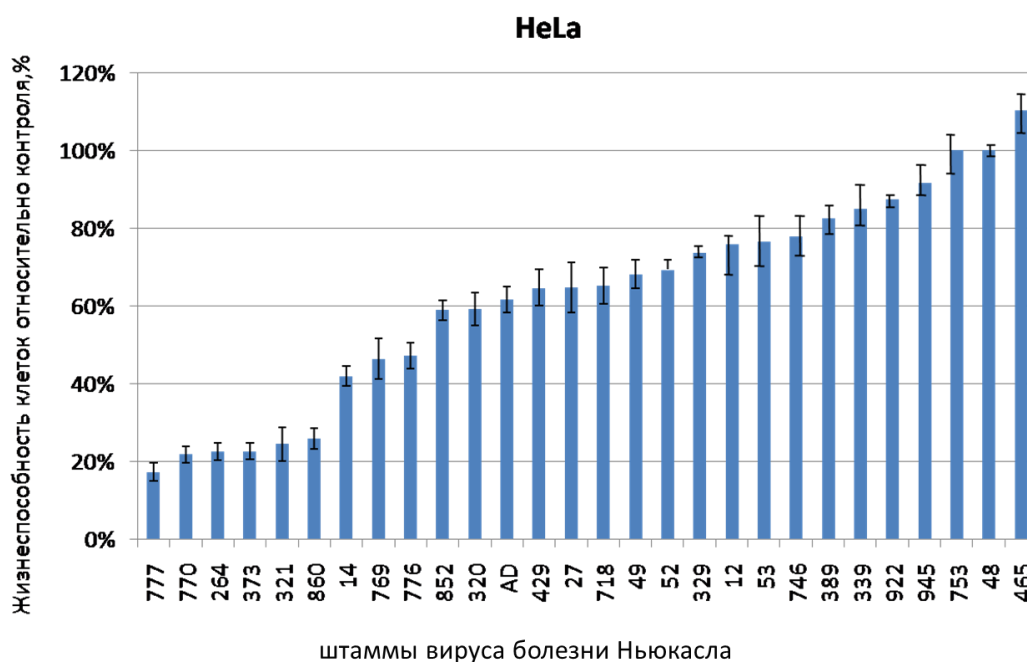


Рисунок 14. Жизнеспособность опухолевой клеточной культуры HeLa после экспозиции со штаммами ВБН, 3-е сутки инкубации. Результаты контроля – клеток HeLa, инкубированных со средой, приняты за 100%, результаты МТТ-теста.

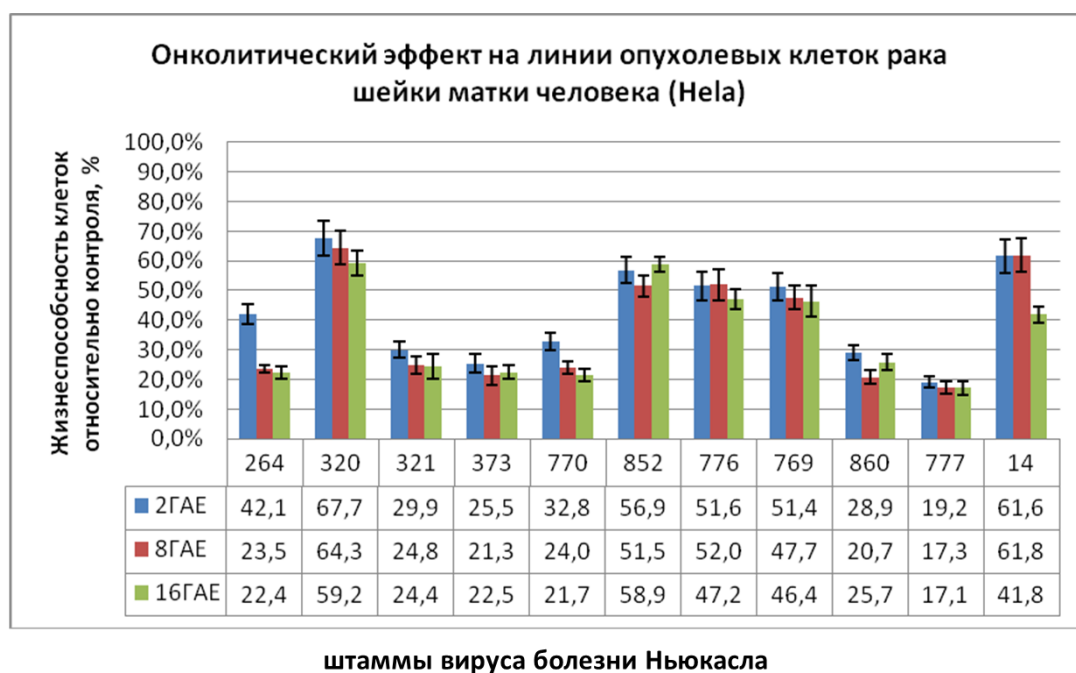


Рисунок 15. Онколитический эффект штаммов ВБН на перевиваемой линии опухолевых клеток рака шейки матки человека (Hela) в системе *in vitro* на четвертые сутки после инфицирования вирусом (дозы 2, 8 и 16 ГАЕ/10,000 клеток), МТТ-анализ.

3.3.3. Исследование цитотоксического воздействия штаммов ВБН на линии клеток немелкоклеточной карциномы легкого A549

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 A549 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 16).

Наиболее выраженный противоопухолевый эффект (до 40% жизнеспособных клеток после инфицирования) на клетках A549 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% (Рисунок 17).

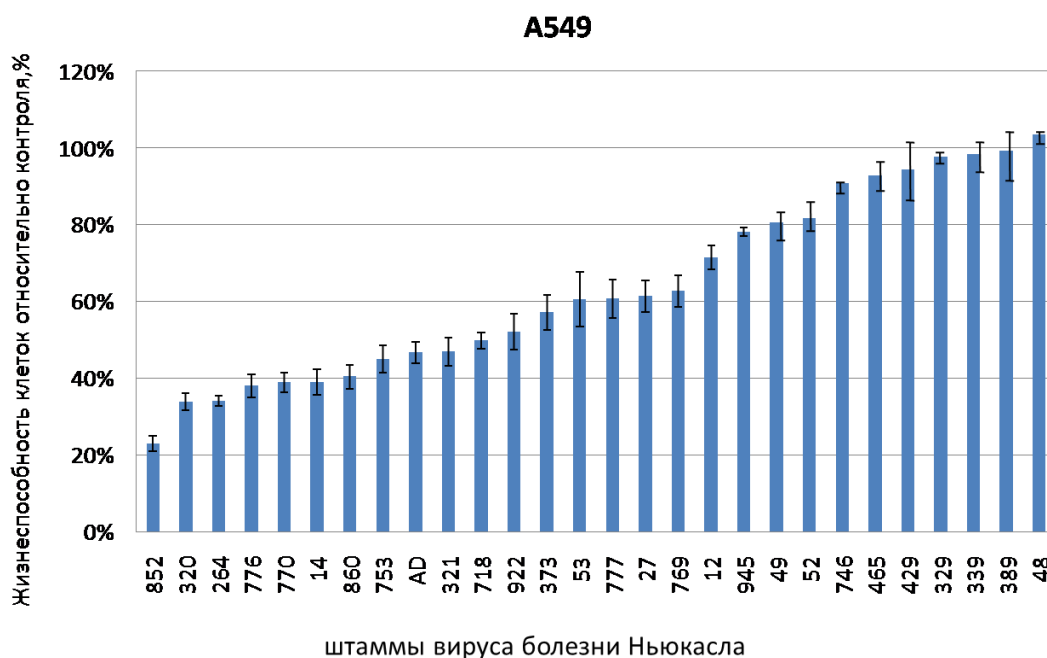


Рисунок 16. Жизнеспособность опухолевой клеточной культуры A549 после экспозиции со штаммами ВБН, 3-е сутки инкубации. Результаты контроля – клеток A549, инкубированных со средой, приняты за 100%, результаты МТТ-теста.

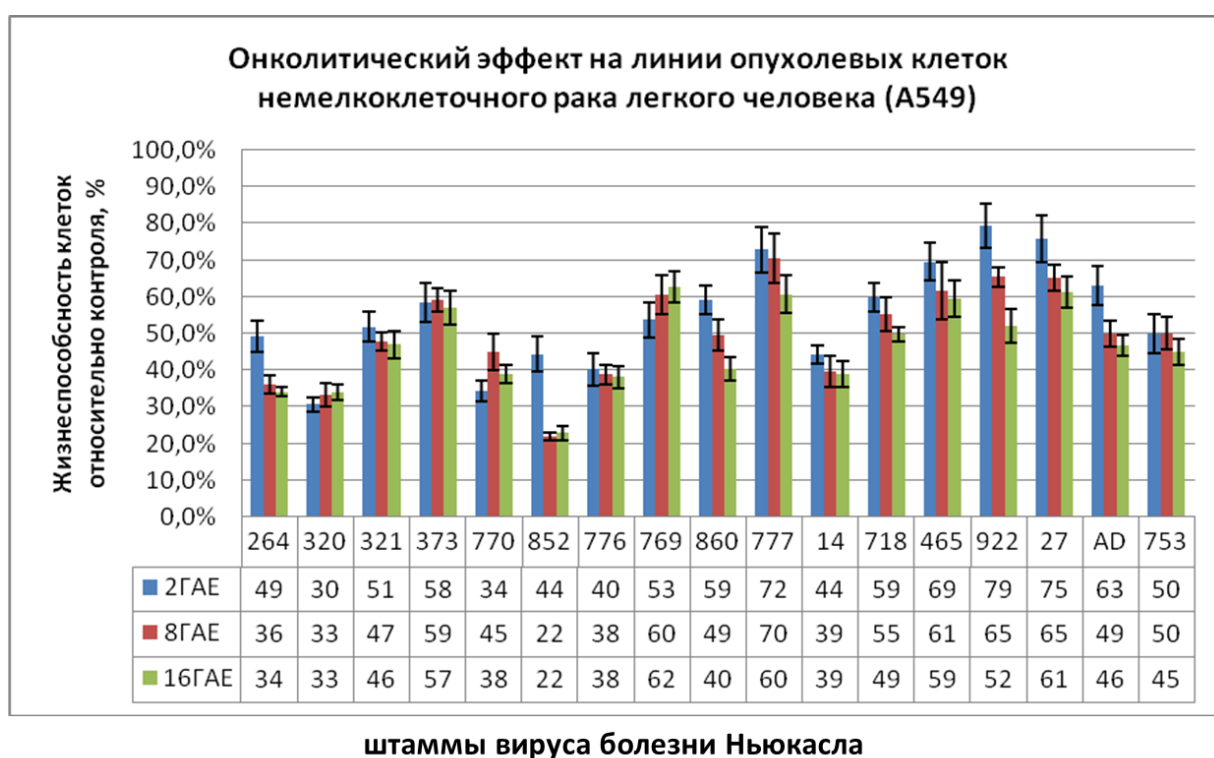


Рисунок 17. Онколитический эффект штаммов ВБН на перевиваемой линии опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого человека (A549) в системе *in vitro* на четвертые сутки после инфицирования вирусом (дозы 2, 8 и 16 ГАЕ/10,000 клеток), МТТ-анализ.

3.3.4. 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 относительно небольшое снижение жизнеспособности после инкубации с вирусами. Онколитический потенциал всех штаммов невысок в отношении клеток MCF7, так как жизнеспособность опухолевых клеток этой линии варьируется от 80 до 100%, что можно видеть по гистограмме (Рисунок 18).

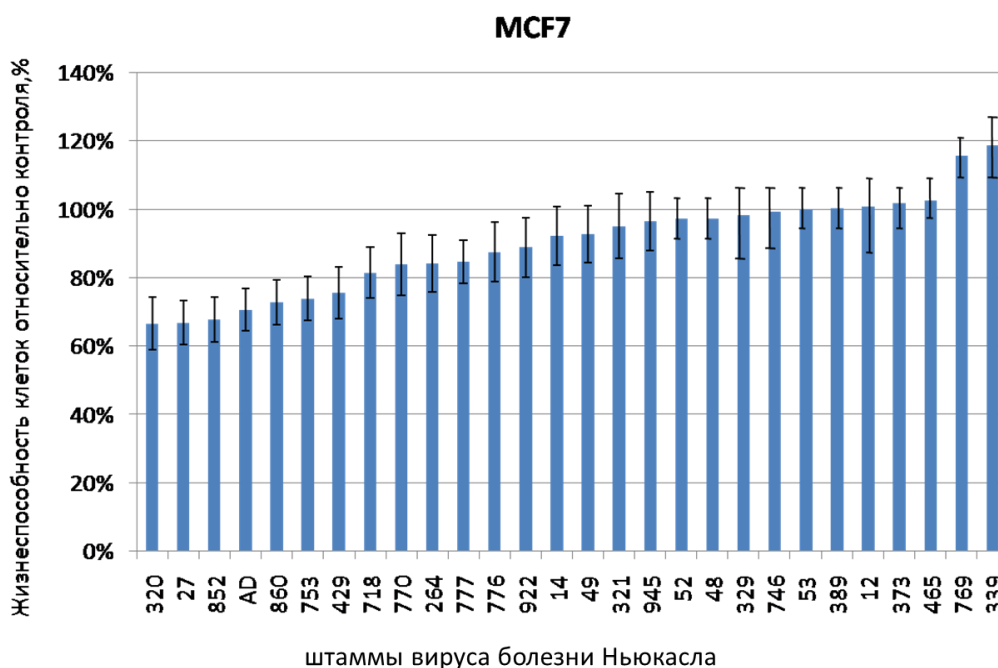


Рисунок 18. Жизнеспособность опухолевой клеточной культуры MCF7 после экспозиции со штаммами ВБН, 3-е сутки инкубации. Результаты контроля – клеток MCF7, инкубированных со средой, приняты за 100%, результаты МТТ-теста.

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 А549 – 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-ми 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 19).

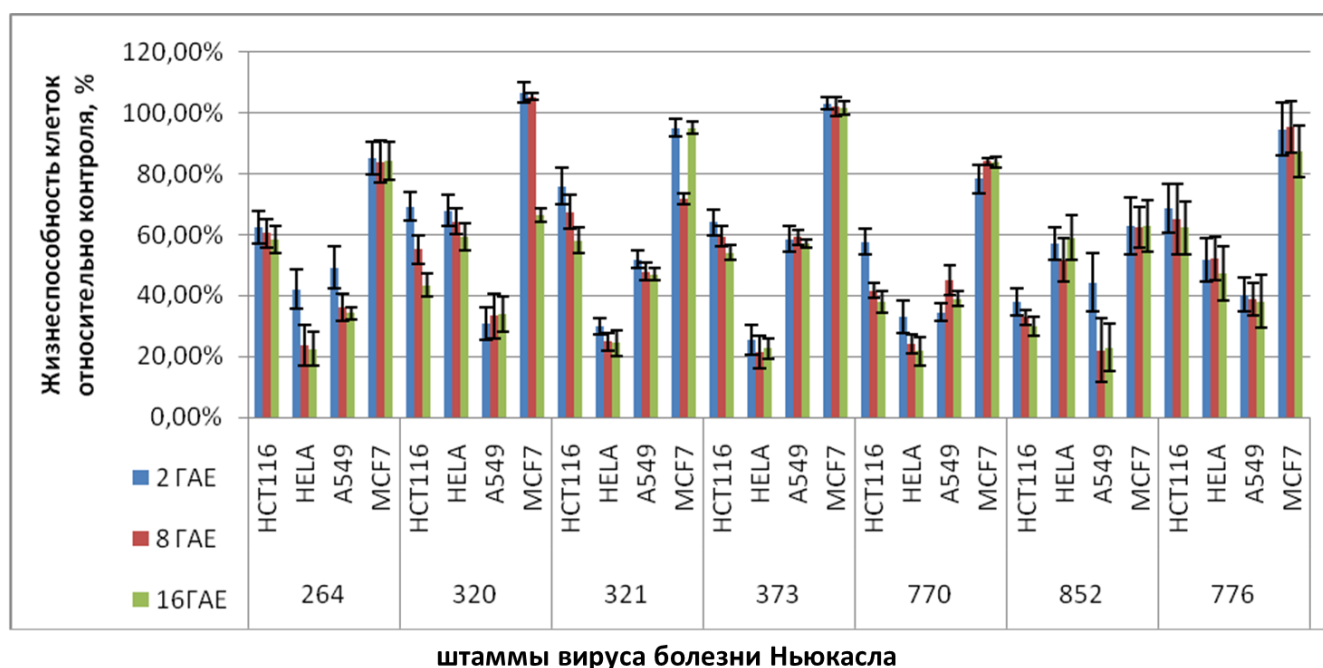


Рисунок 19. Природные изоляты вируса болезни Ньюкасла с наиболее выраженными онколитическими свойствами на всех исследуемых опухолевых клеточных линиях человека, МТТ-анализ.

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.

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 19, 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.

3.4. Оценка цитотоксичности штаммов ВБН на нормальных клетках человека методом МТТ

Чтобы продемонстрировать, что штаммы вируса болезни Ньюкасла обладают цитотоксическими свойствами исключительно на опухолевых клетках, была проведена оценка жизнеспособности нормальных клеток человека при культивировании их в среде с вирусом. В качестве контрольных клеток использовали мононуклеарные клетки периферической крови условно здорового донора с целью подтверждения проявления избирательного токсического действия исключительно на опухолевые клетки.

Для проверки цитотоксических свойств на МНПК было выбрано три штамма. Штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011, продемонстрировавший высокий онколитический потенциал по результатам оценки жизнеспособности опухолевых клеток после инфицирования, был выбран с перспективой использования в дальнейших экспериментах, что требует оценки безопасности на нормальных клетках. Штамм NDV/Yakutiya/mallard/852/2011 также относится к списку штаммов с выраженным цитотоксическим эффектом на опухолевых клетках. Кроме того, оба штамма принадлежат к мезагенному патотипу и вместе с велогенным штаммом NDV/Adygea/duck/12/2008 представляют интерес для проверки цитотоксичности на нормальных клетках человека.

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.

После экспозиции клеток со штаммами вируса жизнеспособность МНПК варьировала в исследуемой группе по сравнению с контрольной в пределе 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.

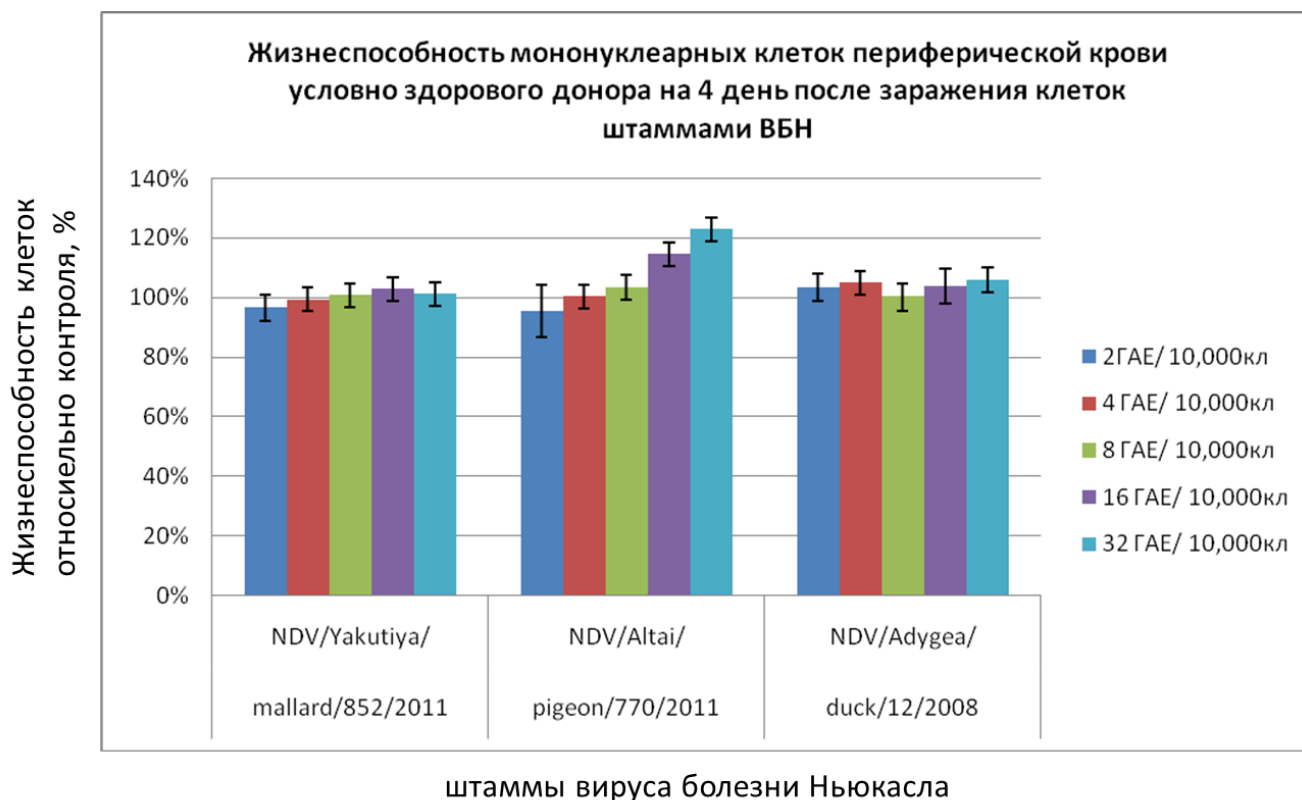


Рисунок 20. Жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови условно здорового донора после экспозиции со штаммами ВБН на 4-е сутки инкубации. Результаты контроля – клеток МНПК, инкубированных со средой, приняты за 100%, МТТ-тест.

3.5. Секвенирование генома штаммов ВБН, проявляющих онколитический потенциал в отношении опухолевых клеток человека в экспериментах *in vitro*

Проведен полногеномный сиквенс двух штаммов ВБН, проявляющих выраженный цитотоксический потенциал на опухолевых клетках - NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Yakutia/mallard/852/2011, а также двух штаммов с менее выраженным потенциалом. Все геномы представлены одноцепочечной несегментированной негативной РНК. Каждый геном состоит из шести генов в следующей последовательности 3'-N-P-M-F-HN-L-5'.

Геном штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 состоит из 15,189 нт. Последовательность сайта расщепления белка слияния (F) содержит несколько основных аминокислот 112K-RQK-R116 на С-конце белка F2 и фенилаланин в положении 117 на N-конце белка F1. В соответствии с этим мотивом в сайте расщепления F2/F1 NDV/Altai/pigeon/770/2011 можно отнести к фенотипу с

высокой вирулентностью. Вирусологические характеристики данного штамма, полученные в тестах MDT=76 ч и ICPI= 0,68, подтверждают принадлежность вируса к мезогенной группе – средней патогенности для цыплят.

Филогенетический анализ показал принадлежность штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 к генотипу VIb класса II. Вирусы генотипа VIb относятся к европейской группе вирусов, и, как и большинство вирусов данного генотипа, были выделены от голубей. Такие вирусы считаются антигенным вариантом вируса болезни Ньюкасла и носят название голубинный парамиксовирус. В 1980-х годах вирусы данного генотипа вызвали масштабную панзоотию среди голубей в Европе. Филогенетический анализ показал, что NDV/Altai/pigeon/770/2011 наиболее близок к штаммам, ранее выделенным в Италии, а также в России в 2005 и 2009 годах. Полная нуклеотидная последовательность генома штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 зарегистрирована в базе GenBank под личным номером KJ920204.

Геном штамма NDV/Yakutia/mallard/852/2011 состоит из 15,186 нт. Последовательность сайта расщепления белка слияния (F) содержит аминокислоты 112G-KQG-R116 на С-конце белка F2 и лейцин в положении 117, N-конец белка F1. В соответствии с этим мотивом в сайте расщепления F2/F1 штамм NDV/Yakutia/mallard/852/2011 отнесется к фенотипу с низкой вирулентностью. Вирусологические характеристики данного штамма, полученные в тестах MDT=116 ч и ICPI= 1,04, позволяют отнести вирус к мезогенной группе на основании показателя ICPI.

Филогенетический анализ классифицировал штамм NDV/Yakutia/mallard/852/2011 в Ib генотип класса II. Вирусы данного генотипа в основном имеют низкую вирулентность и часто обнаруживаются у диких и домашних водоплавающих птиц. Предполагается, что вирусы генотипа Ib, выделенные на Дальнем Востоке, могут передаваться от диких водоплавающих птиц домашним (Liu, 2009). Филогенетический анализ последовательности F-гена показал высокое сходство NDV/Yakutia/mallard/852/2011 со штаммами из Южной Кореи (GenBank № JX401405), Японии (GenBank № KC503411) (Ramey, 2013), Китая (GenBank № KM885166) (Wu, 2015) с другими изолятами, выделенными на Дальнем Востоке России (Ramey, 2013), в Северной Америке (Kim, 2007; Ramey, 2013) и Северной Европе (Швеция) (Tolf, 2013). Таким образом, появление штамма генотипа Ib в Республике Саха, вероятно связано с передачей вируса от перелетных птиц. Полная нуклеотидная последовательность генома штамма NDV/Yakutia/mallard/852/2011 была зарегистрирована в базе GenBank под личным номером KJ920203.

Геномы штаммов NDV/Adygea/duck/12/2008 и NDV/Altai/pigeon/777/2010 состоят из 15,190 нт и 15,192 нт, соответственно. Штамм NDV/Adygea/duck/12/2008 классифицирован как высоко патогенный (велогенный) по результатам MDT=50 ч и ICPI=1,55. Штамм NDV/Altai/pigeon/777/2010 имеет среднюю патогенность (мезогенный) согласно MDT=75 ч и

ICPI=0,61. Сравнительный анализ F-белок-кодирующего гена показал принадлежность штаммов к классу II и содержат многоосновные аминокислотные последовательности в сайте расщепления F белка – 112K-RQK-R116 и фенилаланин в положении 117 (NDV/Altai/pigeon/777/2010) и 112R-RQK-R116 и фенилаланин в положении 117 (NDV/Adygea/duck/12/2008).

Последовательность F-гена NDV/Altai/pigeon/777/2010 аналогична изоляту ВБН Pi/Rus/Кемерово/0267/09 (98%), который относится к генотипу VIb/2 (Pchelkina, 2013). F-ген NDV/Adygea/duck/12/2008 гомологичен штамму Muscovy GI 227460816 (97.47%) (Diel, 2012), который принадлежит генотипу VIId класса II. На сегодняшний день штаммы генотипа VII наиболее часто выделяют при вспышках болезни Ньюкасла в трансах Ближнего Востока и Азии (Miller, 2010). Кроме того, у штаммов данного генотипа отмечают повышение вирулентности и способности вызывать заболевание у видов птиц, которые ранее были не восприимчивы к болезни (Huang, 2004; Liu, 2003). Полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов NDV/Altai/pigeon/777/2010 и NDV/Adygea/duck/12/2008 были зарегистрированы в базе GenBank под личными номерами KT962979 и KP189357, соответственно.

Таблица 5. Строение сайта протеолитического расщепления F белка штаммов вируса болезни Ньюкасла.

Штамм ВБН	генотип	Строение сайта протеолитического расщепления белка слияния	№ GenBank*
NDV/Yakutia/mallard/852/2011	Ib	112GKQGRL117	KJ920203
NDV/Altai/pigeon/770/2011	VIb	112KRQKRF117	KJ920204
NDV/Altai/pigeon/777/2010	VIb/2	112KRQKRF117	KT962979
NDV/Adygea/duck/12/2008	VIIId	112RRQKRF117	KP189357

* - регистрационные номера нуклеотидных последовательностей генов, депонированных в международной базе данных GenBank.

3.6. Получение кроличьих первичных антител к штамму NDV/Altai/pigeon/770/2011

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 среди штаммов с наиболее выраженным онколитическим потенциалом в отношении опухолевых клеточных линий *in vitro* для последующих исследований.

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 уровень титра антител 1:32. Кроликам был повторно введен вирус. Тотальный забор крови (по 45 мл) проводили через 23 дня после повторной иммунизации.

Препарат фракции IgG был выделен из 5 мл исходной кроличьей антисыворотки. Концентрация антител составила 6,6 мг/мл. Общее количество антител составило 39 мг.

3.7. 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, как чувствительной к онколитическому действию вируса культуры (Рисунок 12), и на культуре клеток аденокарциномы молочной железы MCF7, проявляющей резистентность к воздействию штаммов ВБН (Рисунок 18).

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 ГАЕ/10,000 клеток. Иммуноокрашивание не зараженных вирусом контрольных клеток колоректального рака HCT116 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 21).

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

В клетках колоректального рака HCT116 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 HCT116, 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 22).

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 23).

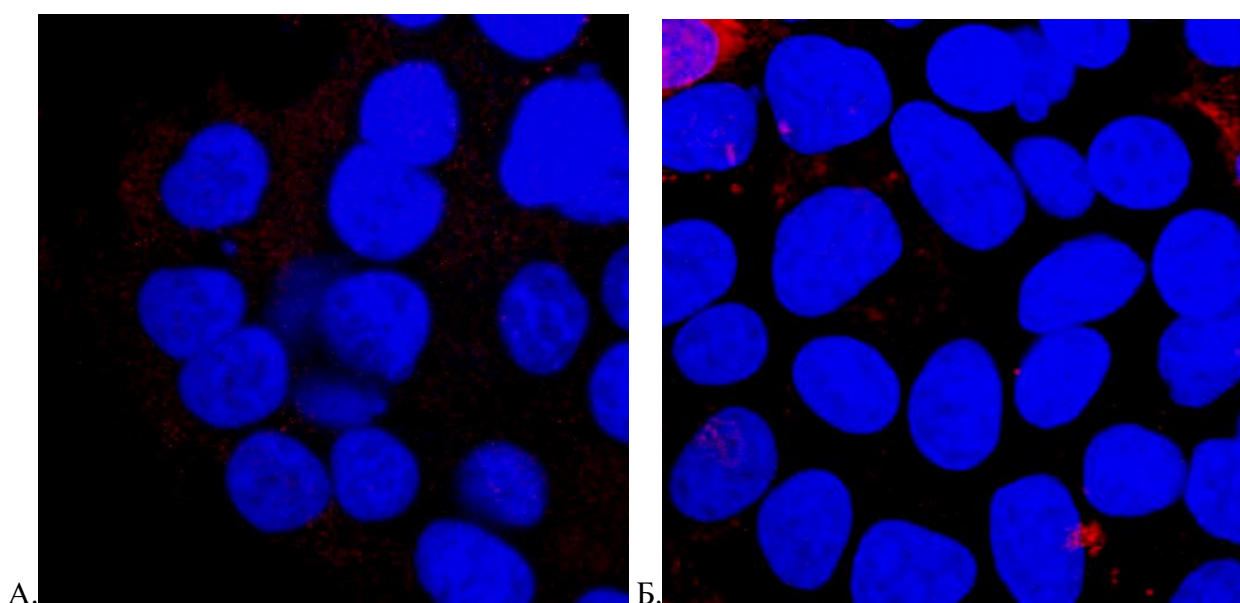


Рисунок 21. А. Иммуноокрашивание контрольных не инфицированных вирусом клеток опухолевой линии колоректального рака человека HCT116. Б. Иммуноокрашивание контрольных не инфицированных вирусом клеток опухолевой линии аденокарциномы молочной железы человека MCF7. Флуоресцентная микроскопия, 100х увеличение. Ядра окрашены DAPI.

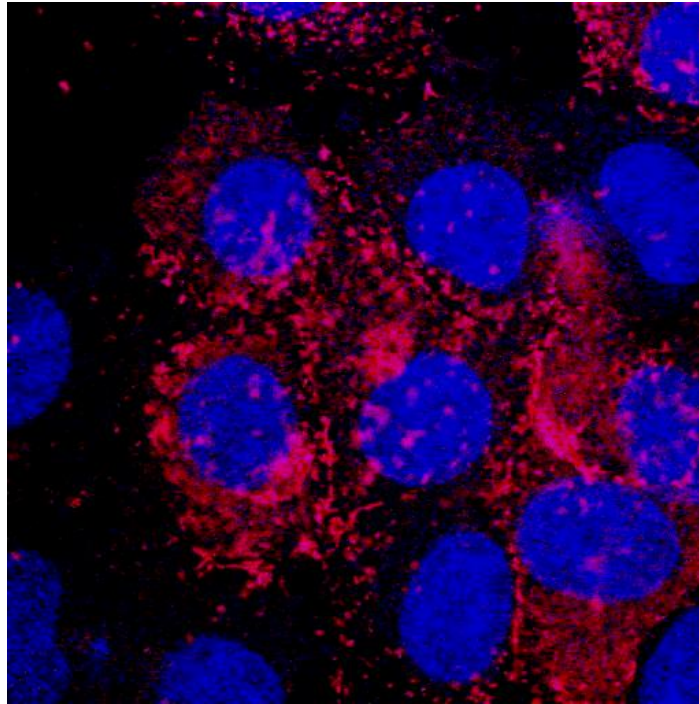


Рисунок 22. Иммуноокрашивание клеток опухолевой линии карциномы толстой кишки человека HCT116, зараженных штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 (разведение 8 ГАЕ/10,000 клеток). Вторые сутки после инфицирования вирусом. Флуоресцентная микроскопия, 100х увеличение. Ядра окрашены DAPI, вторичные антитела – Alexa Fluor® 546.

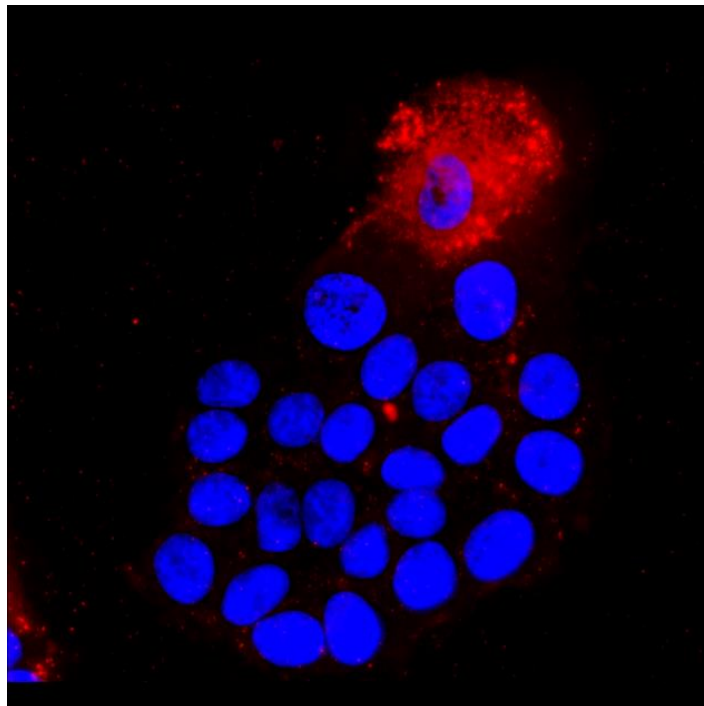


Рисунок 23. Иммуноокрашивание клеток опухолевой линии аденокарциномы молочной железы человека MCF7, зараженных штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 (разведение 8 ГАЕ/10,000 клеток). Вторые сутки после инфицирования вирусом. Флуоресцентная микроскопия, 100х увеличение. Ядра окрашены DAPI, вторичные антитела – Alexa Fluor® 546.

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.

3.8. 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* с использованием выбранных штаммов – мезогенных NDV/Yakutia/mallard/852/2011 и NDV/Altai/pigeon/770/2011 и велогенного NDV/Adygea/duck/12/2008, прошедших исследование на МНПК.

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 24).

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.

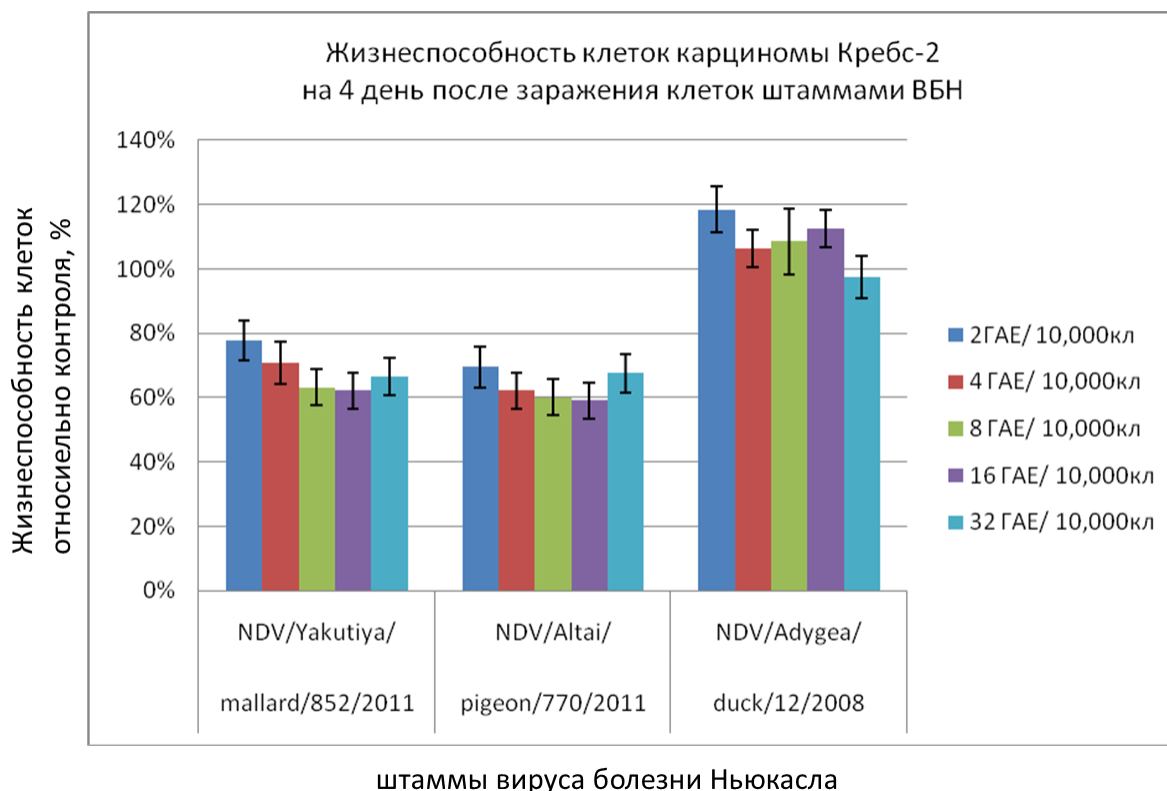


Рисунок 24. Онколитический эффект природных штаммов ВБН – NDV/Yakutia/mallard/852/2011, NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Adygea/duck/12/2008 на клетках мышинной асцитной карциномы Krebs-2 на четвертые сутки после инфицирования.

Результаты исследования показали, что штаммы 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.

3.9. Исследование безопасности штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 в экспериментах на животных

Множество доступных человечеству механизмов было вовлечено в обеспечение безопасности использования онколитических вирусов (ТС, и др., 2008). При выборе определенного штамма всегда учитывается его естественная эпидемиология и патогенетичность, включая наличие натурального иммунитета в человеческой популяции. Так же, при выборе онколитического агента учитываются особенности его внедрения в геном, распространения,

предрасположенности к спонтанной и обратной мутации. Особенности его репликации и тропности к определенным клеткам хозяина, также могут стать критериями для отсева. Одним из основных правил является то, что для дальнейших исследований выбираются вирусы не являющиеся кантагиозными для человека, например вирус болезни Ньюкасла, вирус миксомы или вирус везикулярного стоматита. Еще одним важным критерием является чувствительность вируса к антивирусной терапии.

3.9.1. Исследование острой токсичности при внутривенном введении вируса

При изучении острой токсичности внутривенное введение штамма ВБН NDV/Altai/pigeon/770/2011 мышам линии BALB/c в дозе 6,7 lgTCID₅₀ в объеме 500 мкл инфицирующей жидкости не влияло на общее состояние исследуемых мышей. Симптомы, характерные для клинической картины при развитии острой токсичности, не были зафиксированы на протяжении всего времени наблюдения за животными. Все животные активно потребляли корм и воду, были активны и подвижны, обычной частотой дыхательных движений, без нарушения координации движений. В течение всего времени наблюдения после введения вируса в экспериментальной группе отмечали прирост массы тела у животных, аналогичное прибавки в массе тела контрольных животных, получавших внутривенно физиологический раствор (Рисунок 25).

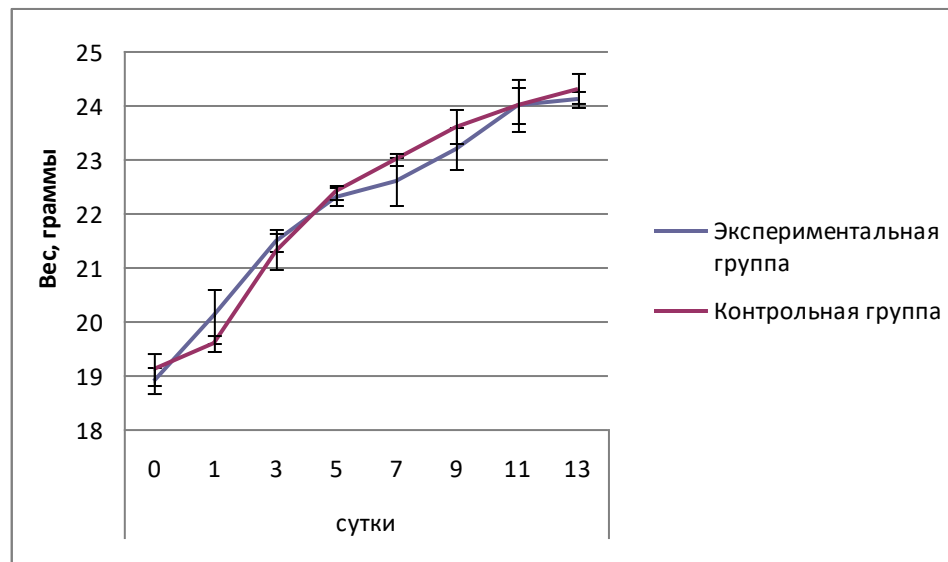


Рисунок 25. Динамика прибавки веса контрольной и экспериментальной групп мышей в эксперименте по определению острого токсического влияния внутривенной инъекции штамма вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 (6,7 lgTCID₅₀ в объеме 500 мкл). Контрольная группа получала инъекции физиологического раствора в объеме 500 мкл.

Однократная внутривенная инъекция вируса в максимальной дозе при максимально допустимом объеме введения инфицирующей жидкости в хвостовую вену не приводила к гибели инфицированных мышей в течение 14 суток эксперимента. В связи с чем, установить LD50 не возможно. Исследуемый штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011 можно считать нетоксичным в испытанной дозе 6,7 lgTCID50 в объеме 500 мкл.

Таким образом, полученные данные подтверждают перспективность проведения дальнейших исследований по изучению безопасности штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 для млекопитающих и получения на его основе безопасного эффективного средства для изучения противоопухолевого потенциала.

3.9.2. Выявление особенностей влияния вируса болезни Ньюкасла на ткани здоровых органов при однократном внутривенном введении штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011

Наличие вирусных частиц штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 в здоровых тканях определяли в реакции ОТ-ПЦР, при инфицировании РКЭ в аллантоисную полость инфицирующей жидкостью из гомогенатов органов и методом титрования гомогенатов органов на монослое клеточной культуры Vero. Оценку репродукции вируса при системном распределении после однократной внутривенной инъекции вируса проводили в органах с наиболее активным кровоснабжением (селезенка, печень, почки, легкое).

По результатам исследования методом ОТ-ПЦР был выявлен один РНК-положительный образец, полученный из гомогената печени, забранной на первые сутки после введения вируса (Таблица 6). Наличие вируса в печени также было подтверждено в процессе наработки инфицирующей жидкости из гомогената в аллантоисной полости в системе РКЭ. Иммуногистологический анализ показал наличие вируса в единичных инфицированных гепатоцитах печени одной мыши на 1-е сутки после внутривенной инъекции (Рисунок 26). На репрезентативном участке среза клетки с ВБН-позитивным иммуногистохимическим окрашиванием располагаются вблизи кровеносных сосудов. Можно предположить, что при системном введении вирус болезни Ньюкасла может локализоваться в единичных клетках печени, лежащих по ходу кровеносных сосудов, но не в толще ткани. Несмотря на выявление вируса в печени, при гистологическом изучении срезов печени мышей линии BALB/c на первые сутки после заражения вирусом отмечали сохранение дольчатого строения и трабекулярных структур. Отсутствовали патологические изменения ткани. Вирус не был выделен из печени в других временных точках ни методом ОТ-ПЦР, ни при наработке на РКЭ, ни при иммуногистохимическом анализе.

Таблица 6. Вирусологические показатели при вскрытии. Органы были собраны на 1-е, 3-е и 5-е сутки после однократной внутривенной дозы вируса (привитые животные) и физиологического раствора (контрольные животные). Образцы тканей гомогенизировали и супернатанты использовали для выделения общей РНК. + положительные, - отрицательные образцы детекции ВБН по результатам ОТ-ПЦР, наработке в аллантаисной полости РКЭ и титровании на клетках Vero.

	1 сутки			3 сутки			5 сутки		
	ОТ-ПЦР	РКЭ	Vero	ОТ-ПЦР	РКЭ	Vero	ОТ-ПЦР	РКЭ	Vero
Селезенка	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Печень	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Легкое	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Почки	-	-	-	-	-	-	-	-	-

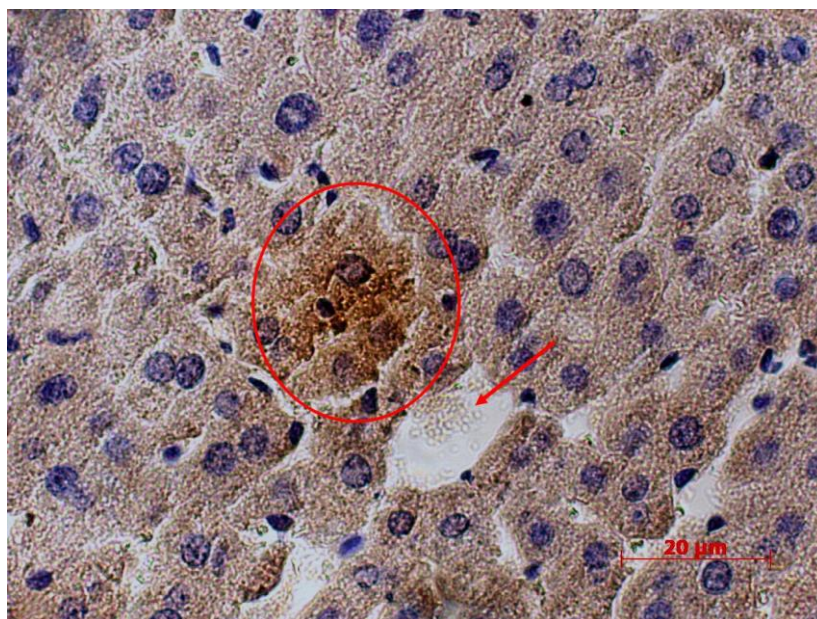


Рисунок 26. Наличие вирусных частиц штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 в гепатоцитах здоровой печени мыши BALB/c линии после внутривенного введения вируса в дозе $6,7 \lg \text{TCID}_{50}$ в объеме 500 мкл инфицирующей жидкости. Стрелкой указан кровеносный сосуд. Иммуногистохимическое исследование печени на первые сутки после инъекции вируса в хвостовую вену. Световая микроскопия, 63x увеличение.

При гистологическом изучении срезов селезенки, легких, печени и почек мышей отмечали сохранение характерного для исследуемых органов строения, отсутствие кровоизлияний, просветы капилляров и артерий свободные, либо с форменными элементами крови. Архитектоника

исследуемых органов сохранена на 1-е, 3-е и 5-е сутки после введения ВБН. Воспалительных и инфильтративных изменений внутренних органов, в том числе в печени на первые сутки после введения вируса, выявлено не было.

Таким образом, штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011 не обладает токсичностью для мышей и не вызывает патологические изменения в жизненно важных органах в используемой дозировке при однократном внутривенном введении. Полученные результаты согласуются с литературными данными и результатами аналогичных исследований штаммов вируса болезни Ньюкасла, описанными зарубежными учеными при изучении рекомбинантных штаммов rNDV-F0 и rNDV-F3aa на яванских макаках (*Macaca fascicularis*) (Vuijs, 2014). В своей работе Vuijs P.R. с коллегами выявил безопасность штаммов вируса болезни Ньюкасла разных вирулентных типов при внутривенном введении исследуемым яванским макакам с сохранением гематологических показателей крови и отсутствием клинических признаков заболевания или токсичности за исключением кратковременного повышения температуры непосредственно после введения инъекций. Анализ распределения вируса в органах показал присутствие вируса в печени макак аналогично результатам внутривенного введения вируса мышам линии BALB/c в настоящей работе, как и подтверждение отсутствия репликации вируса в ткани и патологических изменений ткани внутренних органов.

3.10. Исследование противоопухолевой активности природного штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на опухолевую прогрессию солидного узла мышинной карциномы Кребс-2

3.10.1. Пилотный эксперимент in vivo на мышах линии BALB/C

Предварительный эксперимент по виротерапии штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 проводили на 7-недельных мышах линии BALB/c. 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 256 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 мышцы 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 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 27).

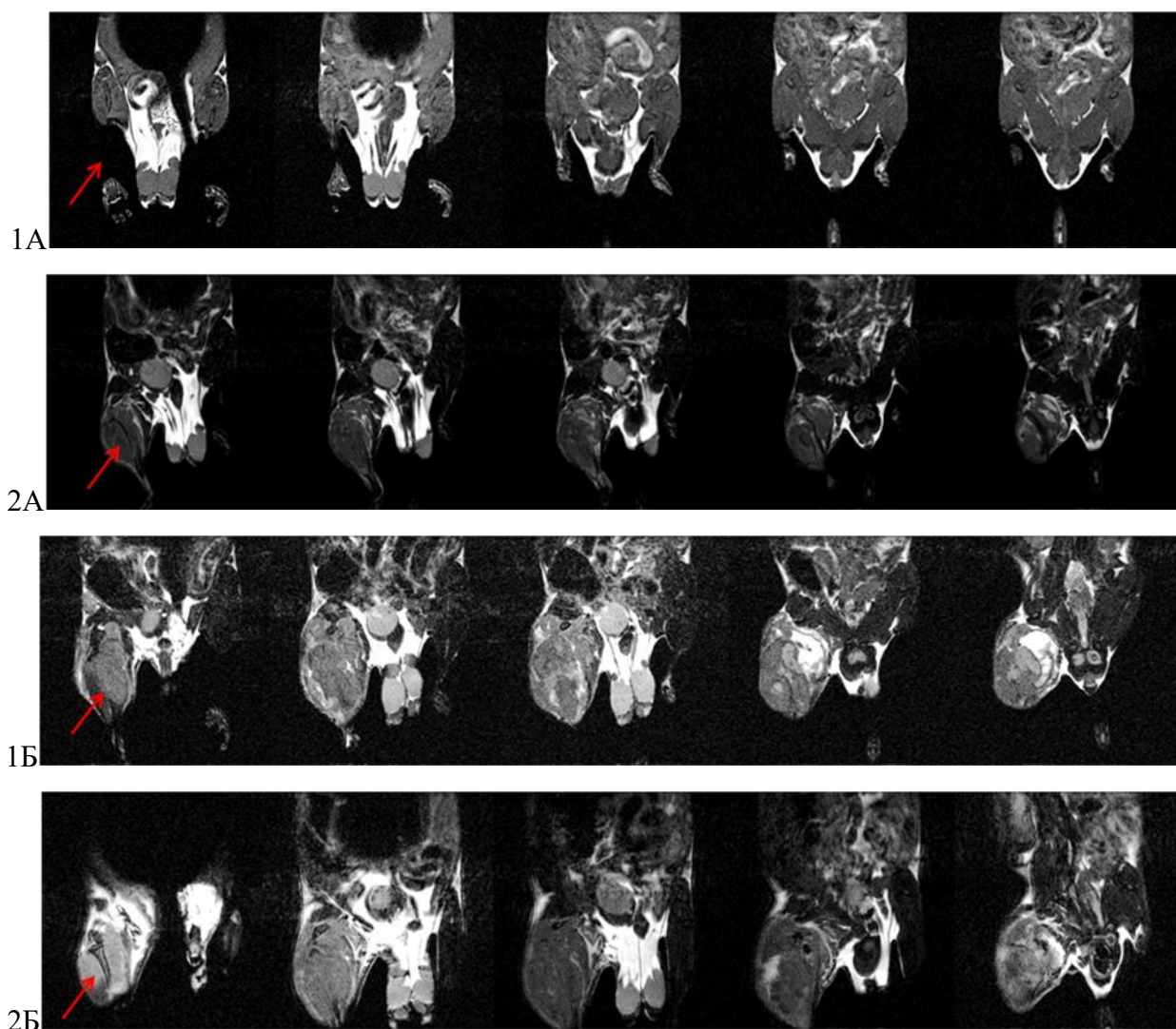


Рисунок 27. Серии МРТ-изображений внутримышечных солидных узлов карциномы Кребс-2 во фронтальной плоскости на 28-е сутки с начала эксперимента на мышах линии BALB/C. Стрелками указано расположение опухоли. А. Экспериментальные мыши, получавшие интратуморально инъекции вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 максимальной концентрации в течение 5-ти дней: 1А – полная регрессия опухоли по сравнению с контрольными животными, 2А - значительная редукция опухоли по сравнению с контрольными животными; 1Б, 2Б. Контрольные мыши, получавшие инъекции физиологического раствора.

3.10.2. Оценка патоморфологических особенностей опухолевой ткани после курса виротерапии в пилотном эксперименте *in vivo* на мышах 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.

Исследование парафиновых срезов материала с привитой опухолью от двух экспериментальных животных, получавших интратуморальные инъекции вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011, подтвердило почти полное отсутствие опухолевой ткани, за исключением отдельных опухолевых островков, у одной мыши (Рисунок 28), и развитие некротических процессов в опухолевом узле карциномы Кребс-2 у второй мыши (Рисунок 29) со значительной регрессией опухоли по сравнению с контрольными не лечеными животными. Зона некротической гибели располагается в центральной части опухолевого узла. При иммуногистохимическом анализе обнаружили вирус болезни Ньюкасла в клетках карциномы Кребс-2 на 20-е сутки после интратуморальной виротерапии. Опухолевые клетки, в которых был обнаружен вирус, располагались преимущественно по периферии некротического очага опухолевого узла (Рисунок 30).

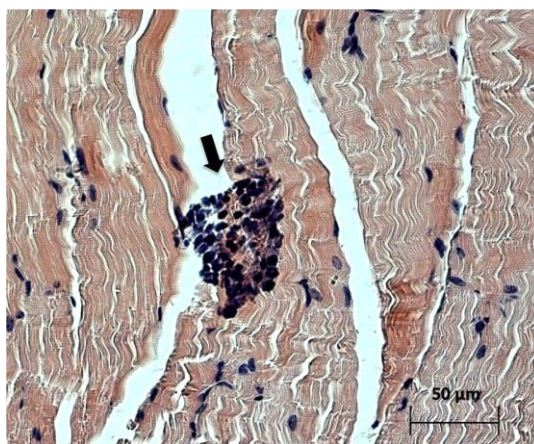


Рисунок 28. Отдельные опухолевые островки (указан стрелкой) карциномы Кребс-2 среди мышечной ткани у мыши, получавшей серию интратуморальных инъекций штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Alai/pigeon/770/2011 и демонстрирующей на МРТ-снимках почти полную регрессию опухоли. 20-е сутки после виротерапии (28-е сутки роста опухоли), окраска гематоксилин-эозин.

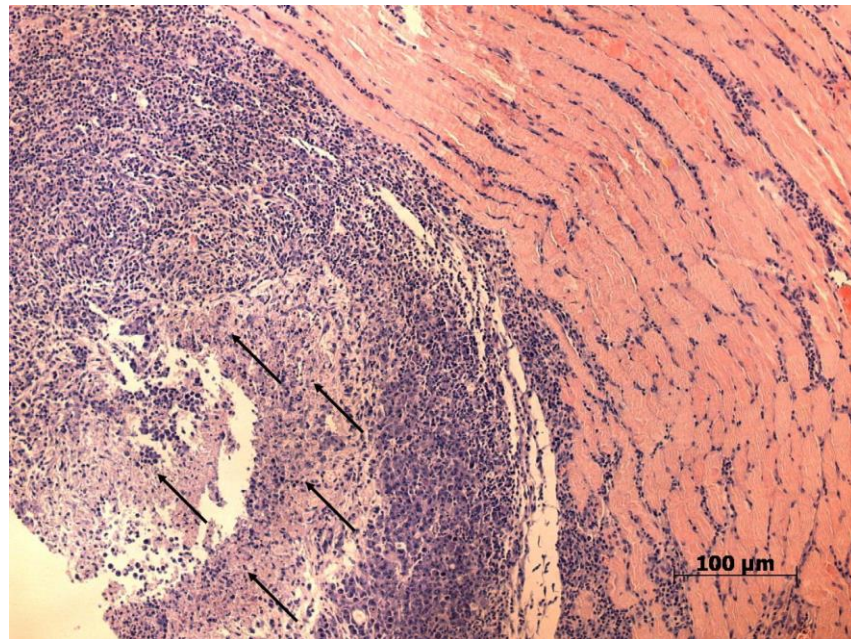


Рисунок 29. Некротические изменения в опухолевой ткани солидного узла карциномы Кребс-2 у мыши, получавшей серию инъекций штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 и демонстрирующей на МРТ-снимках значительную редукцию опухоли. 20-е сутки после виротерапии (28-е сутки роста опухоли), окраска гематоксилин-эозин, увеличение 10х. Стрелками указаны поля некрозов в опухолевом узле.

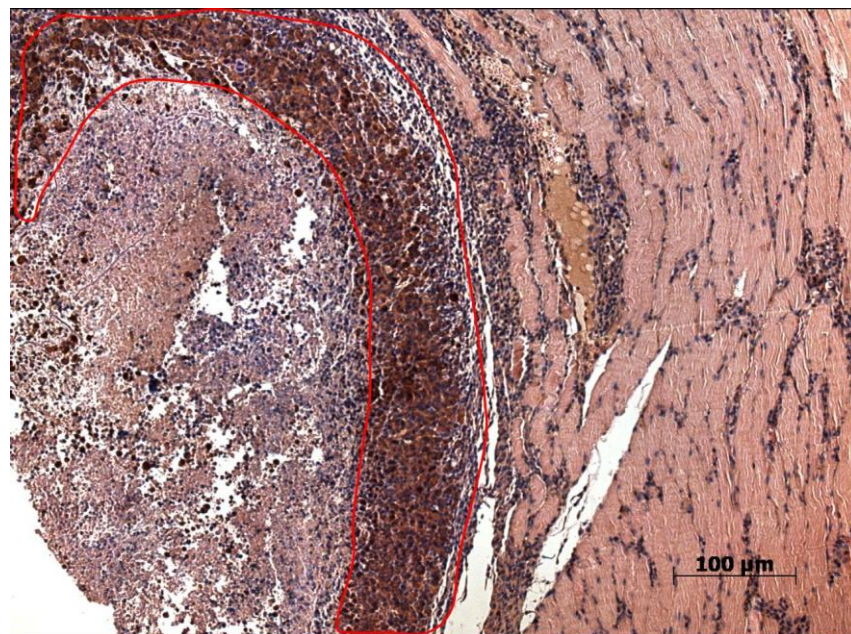


Рисунок 30. Солидный узел карциномы Кребс-2, иммуногистохимическое выявление вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011. 20-е сутки после виротерапии (28-е сутки роста опухоли), докраска гематоксилином увеличение 10х. Линией обведены клетки опухоли, в которых видна положительная реакция с антителами к HN гликопротеину оболочки ВБН.

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 31).

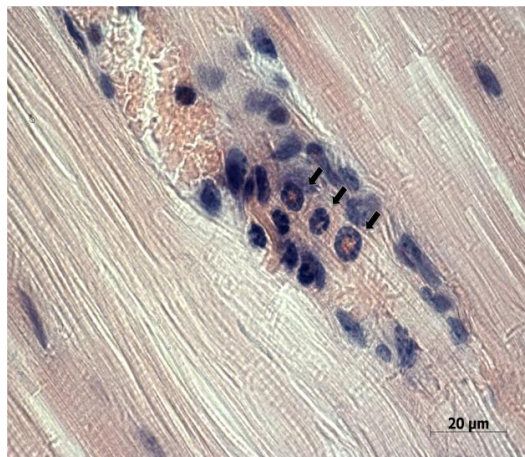


Рисунок 31. Нейтрофилы, лимфоциты и активированные макрофаги (указаны стрелками) в мышечной ткани вокруг опухолевого узла карциномы Кребс-2 у мыши, получавшей серию инъекций штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 и демонстрирующей на МРТ-снимках значительную редукцию опухоли. 20-е сутки после виротерапии (28-е сутки роста опухоли), окраска гематоксилин-эозин.

3.10.3. 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 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 (Рисунок 32-33).

На 20-е сутки (после окончания серии инъекций) средний размер опухоли в группе мышей, получавших инъекции живого вируса болезни Ньюкасла составил $1779,1 \pm 79,98 \text{ мм}^3$, в то время как в контрольных группах мышей, получавших инъекции физиологического раствора и инъекции

неинфицированного куриного аллантаоиса, составил $4659,9 \pm 704,75$ и $4899,1 \pm 807,69$ мм³, соответственно. Результаты динамики роста опухолевых узлов представлены в виде диаграммы как средние относительные значения с учетом стандартной ошибки (среднее относительное значение \pm стандартное отклонение, $M \pm SE$).

На 20 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.

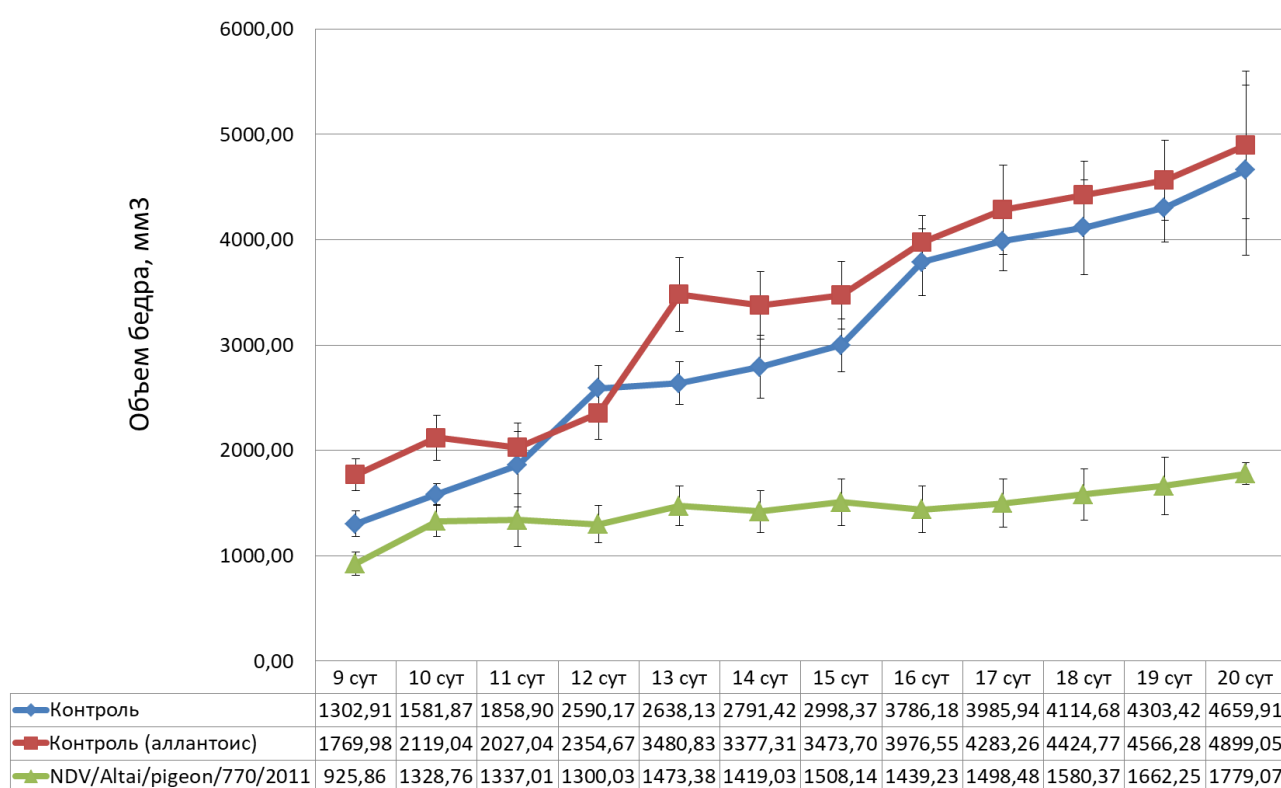


Рисунок 32. Динамика роста опухолевых узлов Кребс-2 у животных контрольных групп (без лечения) и у животных, получавших курс инъекций живого вируса болезни Ньюкасла. Контроль – группа, получавшая инъекции физиологического раствора; Контроль (аллантаоис) – группа, получавшая инъекции неинфицированного куриного аллантаоиса; NDV/Altai/pigeon/770/2011 – группа, получавшая инъекции живого природного штамма ВБН, наработанного в аллантаоиской жидкости РКЭ. сут – сутки после окончания серии инъекций.

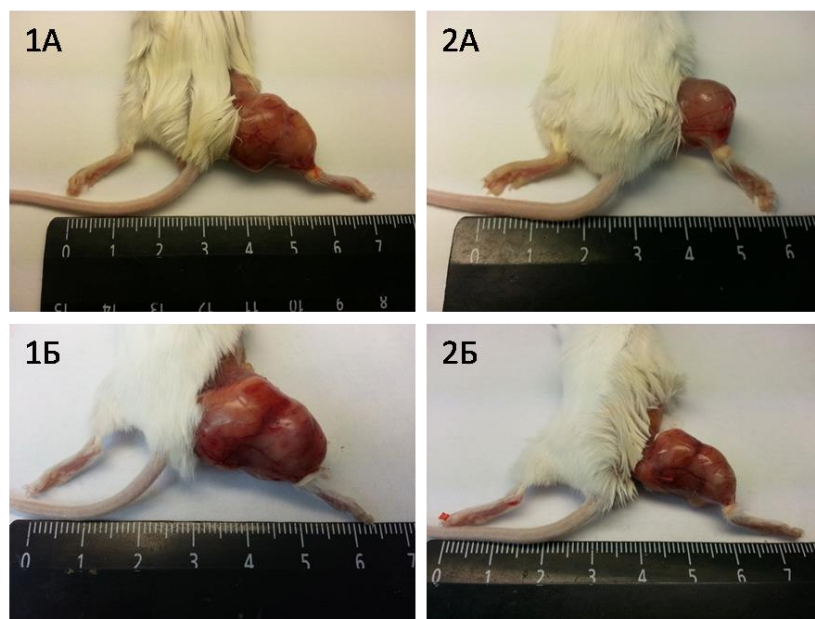


Рисунок 33. Внешний вид животных с опухолями в бедре правой задней лапы. Макроскопический вид конечности с ростом опухоли. 1. Контрольные мыши, получавшие интратуморальные инъекции физиологического раствора. 1А – 18-е сутки роста опухоли, 1Б – 28-е сутки роста опухоли. 2. Экспериментальные мыши, получавшие интратуморально инъекции вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 максимальной концентрации в течение 4-х дней. 2А – 10-е сутки после завершения курса инъекций вируса (18-е сутки роста опухоли), 2Б – 20-е сутки после завершения курса инъекций вируса (28-е сутки 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.

3.10.4. 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 некроза (Рисунок 34). Интратуморальное введение инъекций штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 способствует более ранним и масштабным некротическим изменениям.

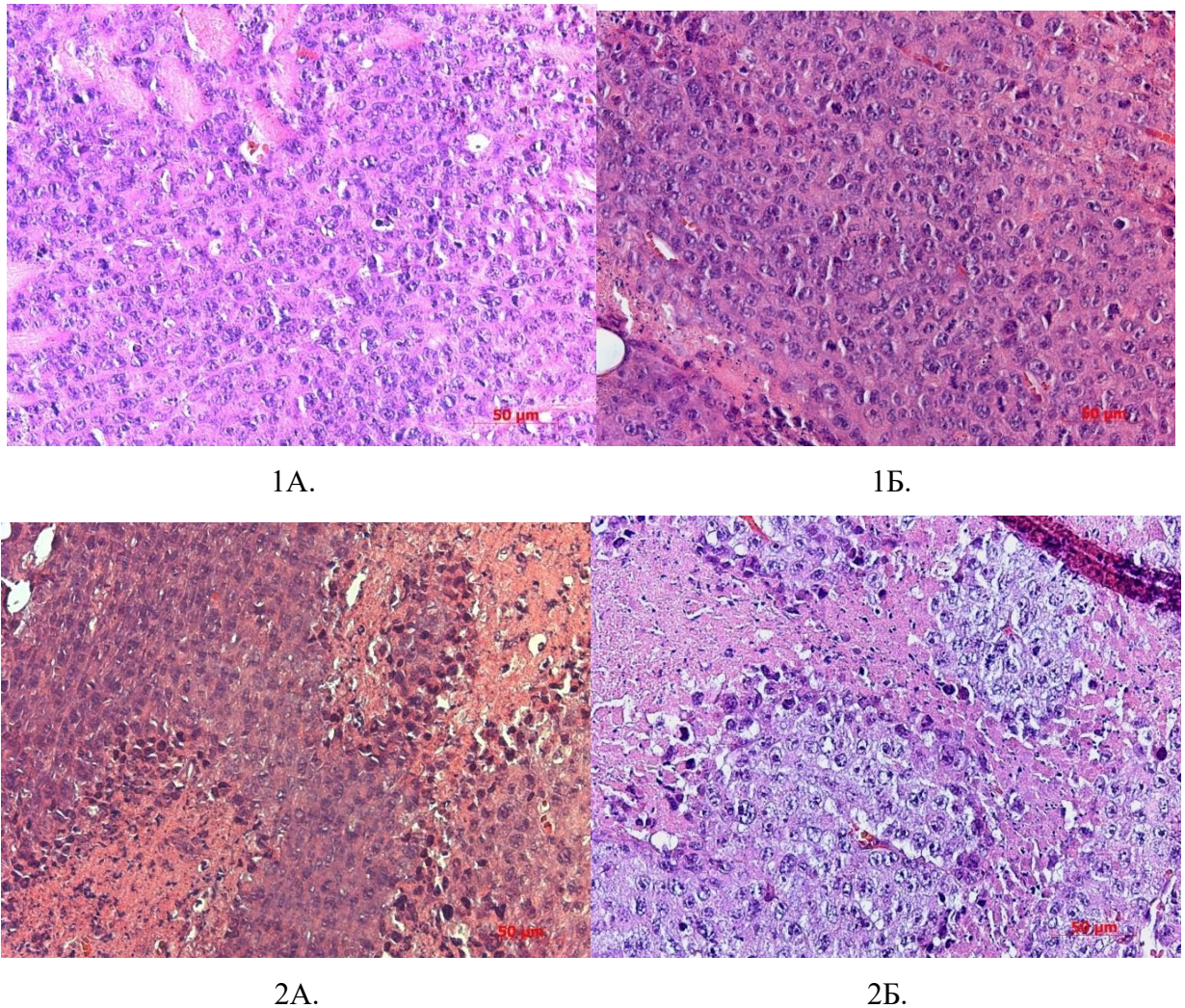


Рисунок 34. Некротические изменения в опухолевой ткани солидного узла карциномы Кребс-2. Рисунок 1А, Б. Участки некроза в опухолевой ткани у мышей без виротерапии на (А) 5-е сутки (13-е сутки роста опухоли), (Б) 20-е сутки (28-е сутки роста опухоли), окраска гематоксилин-эозин, увеличение 40х. Рисунок 2А, Б. Участки некроза в опухолевой ткани у мышей на (А) 5 сутки после виротерапии (13-е сутки роста опухоли), (Б) 20-е сутки после виротерапии (28-е сутки роста опухоли), окраска гематоксилин-эозин, увеличение 40х.

Оценку иммунного статуса после курса виротерапии сложно сделать, так как в опухолевой ткани экспериментальных животных не было обнаружено клеток, свидетельствующих об активации иммунитета – нейтрофилы, лейкоциты, макрофаги. Предположительно это может свидетельствовать о преимущественно прямом способе воздействия вируса на опухолевую ткань путем механизма прямого онколизиса опухолевых клеток с появлением обширных полей некроза.

3.10.5. 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 (Рисунок 34). 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 35).

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 $19,8 \pm 3,55\%$.

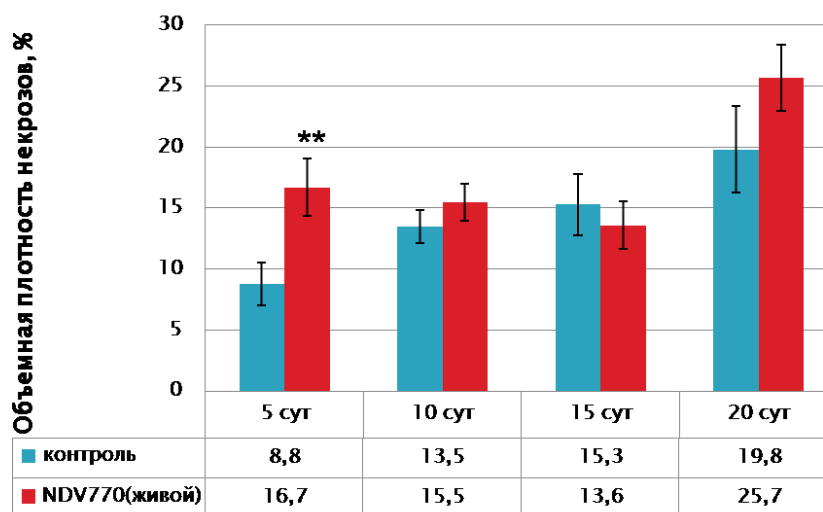


Рисунок 35. Объемная плотность некрозов в опухолевой ткани Krebs-2 в группе животных, получавших инъекции физиологического раствора (контроль), и в группе, получавшей инъекции живого штамма вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011 (NDV770 (живой)) (%). ** $p < 0,01$ относительно контрольной группы. сут – сутки после окончания серии инъекций.

Возможно, что появление обширных полей некрозов в контрольной группе может отражать формирование очагов ишемии в опухолевой ткани, появляющихся в результате быстрого развития опухолевого узла и замедленного неоангиогинеза.

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.

Было отмечено, что 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 36) 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 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.

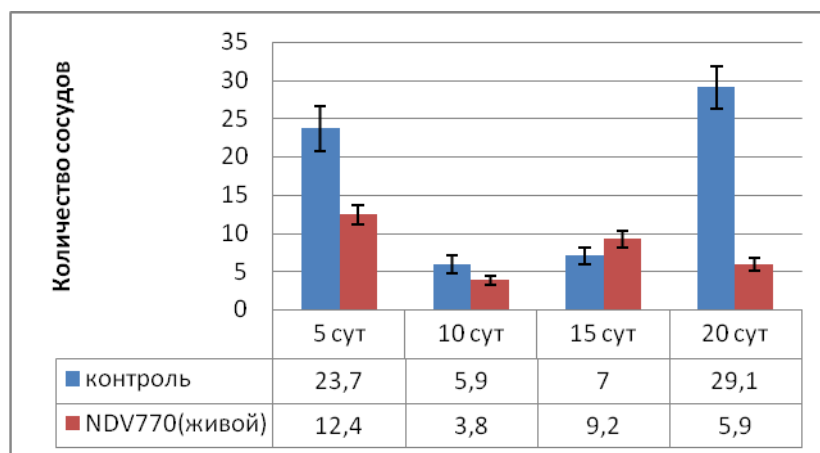


Рисунок 36. Среднее количество крупных сосудов в поле зрения (увеличение 20х). Контроль – группа животных, получавших инъекции физиологического раствора; NDV770 (живой) – группа животных, получавшая инъекции живого штамма вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011. сут – сутки после окончания серии инъекций.

Далее для более точной оценки количества сосудов препараты опухолевой ткани были окрашены на гемопоэтический маркер CD34, результаты подсчета численной плотности эндотелиальных клеток с экспрессией CD34 в опухоли животных представлены на гистограмме (Рисунок 37). Количество сосудов в опухолевой ткани после виротерапии снижено на 5-е и 20-е сутки.

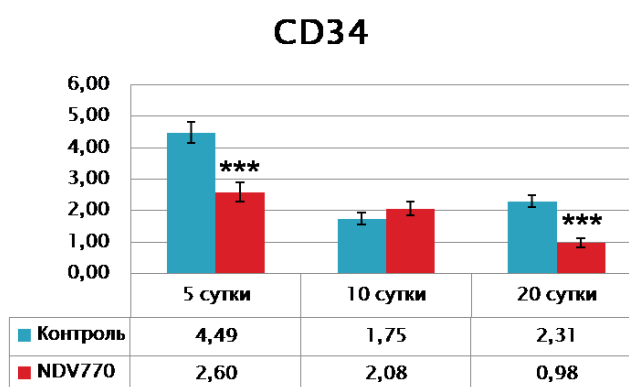


Рисунок 37. Численная плотность эндотелиальных клеток с экспрессией CD34 в опухолевой ткани карциномы Кребс-2 у мышей без лечения (контроль) и после виротерапии живым вирусом NDV/Altai/pigeon/770/2011 (NDV770). *** $p < 0,001$ относительно контрольной группы.

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.

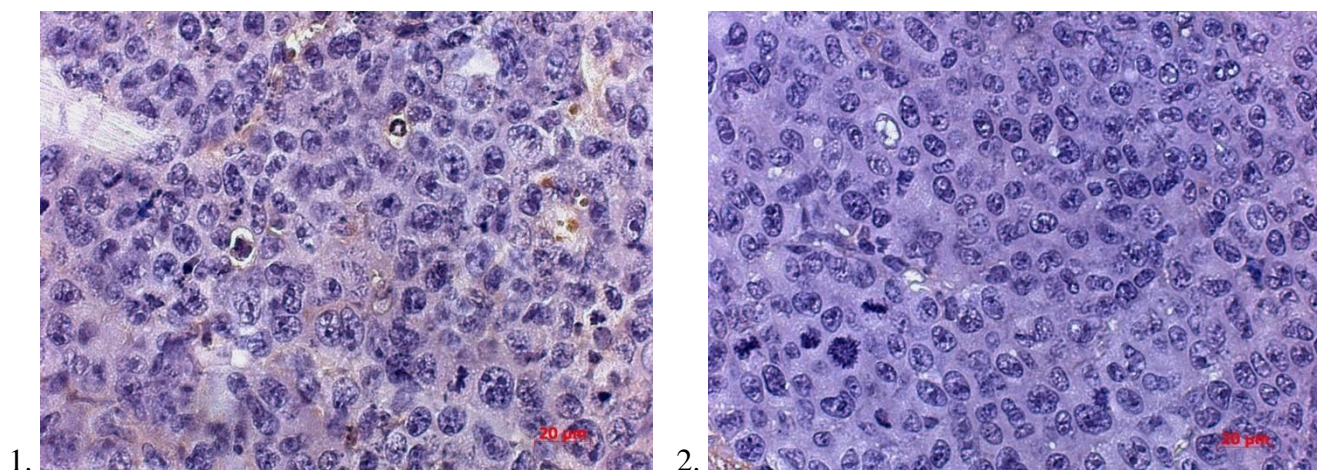


Рисунок 38. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер CD34 в клетках эндотелия в опухолевой ткани у мышей без виротерапии (1) и после курса виротерапии (2) на 20-е сутки после курса инъекций (28-е сутки роста опухоли), иммуногистохимия, увеличение 63х.

Для изучения механизмов торможения неоангиогенеза было проведено исследование с использованием маркера к рецептору фактора роста эндотелия сосудов. Гистограмма (Рисунок 39) 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.

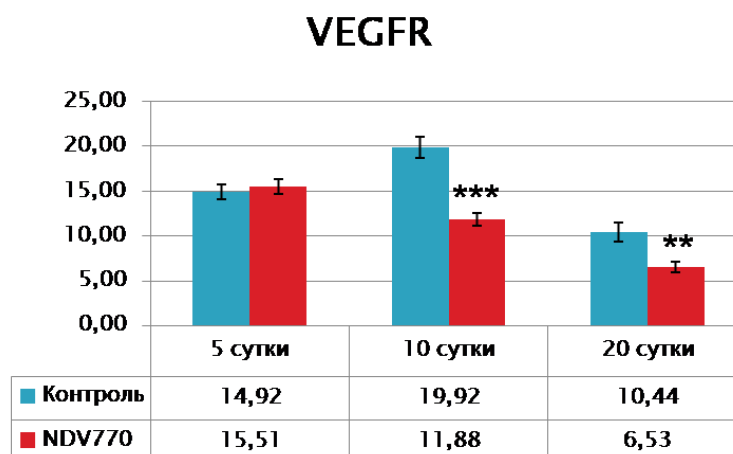


Рисунок 39. Численная плотность эндотелиальных клеток с экспрессией VEGFR в опухолевой ткани карциномы Кребс-2 у мышей без лечения (контроль) и после виротерапии живым вирусом NDV/Altai/pigeon/770/2011 (NDV770). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ относительно контрольной группы. сут – сутки после окончания серии инъекций.

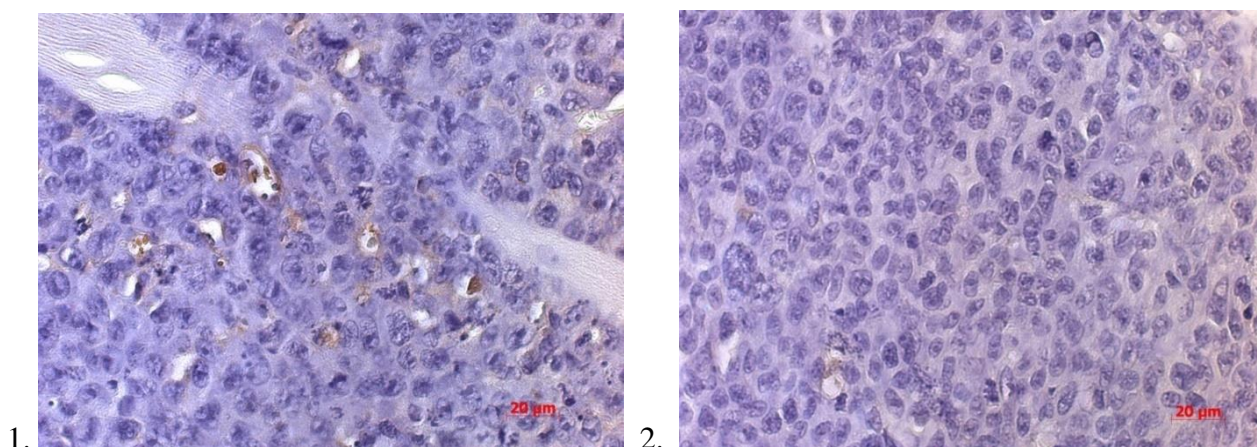


Рисунок 40. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер VEGFR в клетках эндотелия в опухолевой ткани карциномы Кребс-2 у мышей без виротерапии (1) и после курса виротерапии (2) на 20-е сутки после курса инъекций (28-е сутки роста опухоли), иммуногистохимия, увеличение х63.

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/c. 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-е сутки свидетельствует о способности вируса прямо или косвенно воздействовать на неоангиогенез развивающейся опухоли, регулируя трофику ткани, 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

В связи с неуклонным ростом уровня численности онкологических больных уже многие годы сохраняется ориентир на поиск новых методов терапии злокачественных заболеваний и тенденция разработки новых подходов, позволяющих повысить эффективность существующих методов лечения. Широкое распространение идеи использования онколитических вирусов в качестве противоопухолевых агентов для терапии рака и получение обнадеживающих результатов в многочисленных доклинических исследованиях целого ряда виротерапевтических разработок привело к формированию и развитию нового и популярного среди научного сообщества направления таргетной терапии рака - виротерапии. Полученные результаты по итогам клинических испытаний виротерапии опухолей человека определили дальнейшую стратегию развития исследований, связанную с потребностью поиска эффективных онколитических штаммов и исследования механизмов противоопухолевого эффекта для последующего использования в клинической практике нового поколения более мощных терапевтических препаратов на основе вирусов. В настоящее время общепризнанно, что вирусы можно безопасно использовать для лечения различных злокачественных новообразований, о чем свидетельствует появление коммерчески доступных противоопухолевых препаратов для виротерапии опухолей человека.

Таким образом, исходя из роста интереса научного сообщества всего мира за последние несколько десятилетий, можно заявить о виротерапии как одном из перспективных методов лечения онкобольных в ближайшем будущем. Тем не менее, наряду с широкомасштабными исследованиями различных онколитических штаммов и проведения серий клинических испытаний препаратов на их основе, все еще стоит вопрос о нехватке имеющейся информации о механизмах онколизиса и иммуностимуляции, что делает проблему исследования вирусов наиболее актуальной.

Вирус болезни Ньюкасла по своей природе считается не патогенным для млекопитающих. На сегодняшний день ряд работ доказывают, что ВБН безопасен даже при введении высоких доз внутривенных инъекций без серьезных побочных эффектов для человека (Sinkovics, 2000). Среди научной литературы подавляющее большинство виротерапевтических исследований приходится на изучение рекомбинантных штаммов, что связано в первую очередь с необходимостью изменять геном для снижения патогенности штаммов вирусов. В свою очередь снижение патогенности и вирулентности, как правило, приводит к снижению онколитических свойств, что снова требует вмешательства в геном. 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. Большинство исследуемых изолятов были выделены от представителей отряда Гусеобразные и определены как лентогенные штаммы.

Разделение исследовательской работы на три основных этапа позволило проанализировать полученные результаты и оценить потенциал природных штаммов ВБН в качестве противоопухолевого агента. Первый этап работы был направлен на подготовку природных изолятов из коллекции к проведению исследования онколитического потенциала штаммов на опухолевых клеточных линиях человека.

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. Можно предположить, что низкий уровень гемагглютинирующего титра среди 16 штаммов, объясняется двумя причинами: во-первых, изначально низкий уровень инфекционного титра, который определяет живые способные к репликации вирусные частицы, а не только уровень гемагглютинина, и как следствие низкий уровень вирулентности для РКЭ, во-вторых, низкая репликативная активность и патогенность для РКЭ и недостаточный уровень вируса для детекции методом РГА.

Была проведена оценка инфекционного титра - тканевой цитопатической дозы вируса, при которой погибает 50% клеток (lgTCID₅₀/мл). Цитопатическое действие, наблюдаемое на 4-е сутки после инфицирования чувствительной клеточной линии Vero, характеризовалось округлением клеток с последующей клеточной гибелью и откреплением от монослоя. Образование синцитиев, или многоядерных клеток, описанное в научной литературе, как характерное для большинства представителей семейства *Paramyxoviridae*, наблюдалось только при инфицировании клеток культуры Vero штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011. Возможно, это связано с тем, что при инфицировании используются природные неадаптированные к клеточным культурам и не аттенуированные штаммы, которые, быстро реплицируясь в клетке, запускают механизм клеточной гибели, при которой изменение в клетке, цитоплазме и мембране не позволяют формированию сливающихся в синцитий клеток.

Однако инфекционный титр IgTCID₅₀ удалось определить не для всех изолятов ВБН. Возможно, это связано с невысокой онколитической активностью и принадлежностью к нелитическим штаммам, для которых характерны моноциклические репликации в клетке-мишени без высвобождения инфекционного потомства.

Второй этап работы заключался в оценке противоопухолевого потенциала среди природных изолятов ВБН из имеющейся коллекции в отношении четырех перевиваемых опухолевых клеточных линий человека различного гистогенеза и этиологии с целью поиска новых перспективных кандидатов в качестве противоопухолевого агента. Для того, чтобы сравнивать противоопухолевый потенциал было решено использовать гемагглютинирующие единицы для подсчета доз при инфицировании клеток.

В предыдущих исследованиях коллективом сотрудников НГУ и НИИЭКМ ФИЦ ФТМ уже были продемонстрированы безопасность штаммов ВБН для здоровых нормальных клеток человека – культуры клеток фибробластов (ФЭЧ-15) (Корчагина, 2012; Максимова, 2012). В данной работе в качестве нормального контроля были взяты мононуклеары периферической крови условно здоровых доноров (МНПК). Кроме того, при анализе результатов изучения острой токсичности при внутривенном введении животным (мыши) штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/770/2011 в дозе 6,7 IgTCID₅₀ в объеме 500 мкл инфицирующей жидкости признаков острой токсичности не было выявлено и отсутствовала летальность. В связи с чем, изучаемый препарат можно отнести к нетоксическому классу в исследуемой дозировке.

Большинство из исследуемых природных изолятов ВБН демонстрирует онколитический потенциал на опухолевых клеточных линиях человека различного происхождения. При этом наибольшую резистентность к онколитическому действию природных изолятов вируса демонстрирует опухолевая линия аденокарциномы молочной железы MCF7.

Чувствительными к действию разных природных изолятов оказались линии клеток колоректальной карциномы HCT116, карциномы шейки матки HELA и немелкоклеточной карциномы легкого A549. Среди чувствительных линий наиболее низкий процент жизнеспособных клеток после инкубации с разными штаммами ВБН показали культуры клеток Hela и A549.

Изоляты NDV/Altai/pigeon/777/2010 и NDV/Altai/pigeon/770/2011 продемонстрировали наиболее выраженный онколитический потенциал на культуре клеток HELA, о чем свидетельствуют результаты жизнеспособности клеток после инкубации с вирусами в дозе 16 ГАЕ/10,000 клеток – 17,17%±2,36% и 21,71%±2,10%, соответственно. Изоляты NDV/Altai/pigeon/777/2010 и NDV/Altai/pigeon/770/2011 были выделены от сизого голубя и относятся к группе голубиных парамиксовирусов серотипа 1, в которую входят антигенные варианты вируса болезни Ньюкасла, выделенные от голубей. Поэтому такая высокая

противоопухолевая активность этих изолятов возможно связана с особенностями репликативного комплекса у данных штаммов, а также повышенной чувствительностью культуры линии HELA к онколитическому действию ВБН. Наиболее выраженный онколитический потенциал на опухолевой линии клеток A549 показывают штаммы NDV/Yakutia/mallard/852/2011, NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, NDV/mallard/Amur/264/2009 и NDV/Altai/pigeon/770/2011 (22,96%±1,95%, 33,94%±2,17%, 34,15%±1,34% и 38,89%±2,54 жизнеспособных клеток после инфицирования вирусом в дозе 16 ГАЕ/10,000 клеток, соответственно).

Показаны значительные различия чувствительности разных опухолевых клеточных линий к онколитическому действию природных штаммов ВБН. Как было продемонстрировано в предыдущих экспериментах *in vitro*, онколитический эффект вируса не зависит от этиологии опухолевых клеток.

Дана оценка наличия дозозависимого эффекта онколитического действия штаммов при увеличении дозы с 2 ГАЕ/10,000 клеток до 16 ГАЕ/10,000 клеток. При этом литическая способность штаммов на четвертые сутки после заражения при минимальной дозе в 2 ГАЕ/10,000 клеток в среднем на 10% ниже. Такая невысокая разница может быть обусловлена высокой репликативной способностью штаммов в клетке, при которой спустя несколько циклов репликации и высвобождения многочисленного инфекционного потомства, инфекционный титр вируса в клеточной среде выравнивается в лунках с инфицированным монослоем дозой 2, 8 и 16 ГАЕ/10,000 клеток.

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 (Рисунок 19).

Все пять штаммов выделены от разных видов представителей отряда Гусеобразных (кряква, чирок-свистун, чирок-трескун, широконоска) и являются лентогенными штаммами (по результатам тестов MDT и ICPI). Онколитический потенциал всех семи изолятов незначительно отличается в отношении разных опухолевых клеточных линий, однако наиболее выраженный противоопухолевый эффект, отмеченный для всех исследуемых клеточных линий, наблюдается для штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 – от 20 до 40% жизнеспособных клеток линий HCT116, A549 и HELA после инкубации с максимальной дозой вируса и около 80% для резистентной линии MCF7.

Для более детального изучения различий в реализации онколитических свойств природных изолятов ВБН в дальнейших работах необходимо исследовать возможные различия механизмов проникновения вирусов в опухолевые клетки различной этиологии и гистогенеза, репликации и высвобождения инфекционного потомства, провести оценку влияния генетических нарушений опухолевых клеток на программу реализации онколитических свойств при виротерапии. Так, например, было показано, что для успешной репликации ВБН необходима активация Ras-пути, а именно его ветви, связанной с малой GTP-азы Rac1 (Puhlmann, 2010). Однако в настоящем исследовании, несмотря на активацию Ras-пути в клетках опухолевой линии MCF7 (амплификация Her), реализация противоопухолевого потенциала в данной линии не была достигнута в полной мере ни с одним исследуемым штаммом.

Чтобы проследить влияние курса виротерапии на развитие опухолевой прогрессии и изменения в структуре опухолевой ткани после введения вируса, третья часть экспериментальных работ была посвящена исследованиям на опухолевой модели карциномы Кребс-2. Ссылаясь на опыт проведения вивальных экспериментов, описанных в научной литературе при исследовании на разных опухолевых моделях и при терапии разными штаммами вирусов, была подобрана доза перевивки клеток карциномы Кребс-2, доза вируса, объем, количество и способ введения инъекций.

В эксперименте с перевитой внутримышечно в бедро задней лапы 500,000 клеток карциномы Кребс-2 опухоль развивалась агрессивно: быстрый опухолевый рост в контрольной группе не леченных животных на начальных этапах приводил к экспансивному быстрому разрастанию опухолевой ткани. При данном типе роста быстро увеличивающийся в мышечной ткани солидный узел сдвигает окружающие ткани, приводя к их атрофии. Однако на поздних сроках преобладает инфильтрирующий рост опухоли по пути наименьшего сопротивления распространения опухолевых клеток по межтканевым соединениям, так как границы опухоли определить невозможно.

Разрастание опухолевой ткани ведет к сдавливанию кровеносных сосудов, в связи с чем наступает компрессионное малокровие, которое при длительном действии развивается в дистрофические изменения ткани. Таким образом, рост объемной плотности некрозов в опухолевой ткани в динамике на первых и на последующих сроках морфологического исследования препаратов может быть результатом ишемического некроза, при котором быстро и агрессивно развивающейся опухолевой ткани не хватает притока крови, вследствие чего наступает гипоксия и гибель ткани. Однако, учитывая это, на фоне курса виротерапии штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 к 5-м суткам отмечается высокий уровень показателя плотности некрозов по сравнению с контрольными не лечеными опухолями. Считается, что для организма предпочтительнее апоптотическая клеточная гибель опухолевых клеток как физиологический

процесс, нежели некроз, который способствует воспалению и развитию более агрессивных и быстрорастущих опухолей из-за стимулирующей роли воспаления при опухолевом росте и геномной нестабильности опухолевых клеток (Baig, 2016). Однако также показано, что после противоопухолевой терапии в тканях наиболее распространенных опухолей эпителиального происхождения редко можно обнаружить апоптоз *in vivo*, а *in vitro* он может быть вызван только относительно высокими дозами облучения и препаратов, которые крайне велики в перерасчете на терапевтические дозы для человека (Proskuryakov, 2010). Некроз солидных опухолей *in vivo* может наблюдаться довольно часто после лечения рака, что связано в большинстве случаев не с прямой активацией механизмов некротической гибели, а результатом таких вторичных изменений в ткани, как нарушение снабжения быстрорастущих опухолевых клеток кислородом и питательными веществами. Тем не менее, после противораковой терапии, некроз может обеспечить изменение опухолевого роста и общей прогрессии развития опухоли, а также активировать иммунный ответ пациента вследствие появления очага воспаления от некротизированных опухолевых клеток.

Кроме того, данные из литературных источников о взаимосвязи активации процессов клеточной гибели путем апоптоза и некроза с возможной активацией аутофагии под действием виротерапии вирусом болезни Ньюкасла требуют последующего детального исследования механизмов противоопухолевого действия вируса.

При этом необходимо отметить, что 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 НСТ116+/, 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 НСТ116+/, 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 гемопоэтическим 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Автандилов - Москва: Медицина, 1990. - 384 с.
2. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев - Ленинград : Медгиз, Ленинградское отделение, 1962. – 180 с.
3. Вдовиченко, Г. В. Безопасность и противоопухолевая активность кандидатного терапевтического препарата "Канцеролизин", созданного на основе делеционного аденовируса человека 5-го типа: диссертация ... кандидата медицинских наук: 03.02.02 / Вдовиченко Галина Владимировна; [Место защиты: ФГУН "ГНЦ вирусологии и биотехнологии "Вектор"].- Кольцово, 2012.- 127 с.
4. Зонов, Е.В. Противоопухолевый эффект апоптин-индуцирующего рекомбинантного штамма вируса осповакцины *in vivo* связан с блокированием митотического деления опухолевых клеток / Е.В. Зонов, Г.В. Кочнева, А.В. Тупицына и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – 34. - №4. – С. 154-159. doi: 10.18821/0208-0613-2016-34-4-154-159.
5. Кешелава, В.В. Онколитический вирус болезни Ньюкасла и аутологичные опухолевые клетки в комплексной терапии рака / В.В. Кешелава // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2007. – 3 (34). – С. 23-28.
6. Кешелава, В.В. Органосохраняющее лечение рака молочной железы с применением онколитического вируса болезни Ньюкасла / В.В. Кешелава, Н.Ю. Добровольская, М.В. Подольская и др. // Вестник РНЦРР МЗ РФ. - 2009. – 1 (9). – С. 10.
7. Кешелава, В.В. Результаты исследования онколитического вируса болезни Ньюкасла в неoadьювантной терапии рака молочной железы за 3-х летний период наблюдения / В.В. Кешелава, Н.Ю. Добровольская, М.В. Подольская и др. // Вестник РНЦРР МЗ РФ. - 2010. – 1 (10). – С. 24.
8. Корчагина, К.В. Морфологическое изучение влияния вируса болезни Ньюкасла штамма NDV/Adigea/duck/8 на ультраструктурную организацию нормальных и опухолевых клеток человека в культуре / К.В. Корчагина, Н.В. Губанова, Д.А. Максимова и др. // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – 10 (2). – С. 84 - 93.
9. Максимова, Д.А. Исследование чувствительности опухолевых клеточных культур человека к вирусам болезни Ньюкасла / Д.А. Максимова, К.В. Корчагина, Н.В. Губанова и др. // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – 10 (2). – С. 94 - 100.
10. Максютков, Р.А. Создание современной платформы, содержащей набор онколитических вирусов с иммуностимулирующими свойствами / Р.А. Максютков, Т.В. Трегубчак, Н.И. Денисова и др. // Российский иммунологический журнал. - 2013. – 7 (16). - №4. - С. 456-459.

11. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунятыч, А.Н. Васильев и др. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
12. Нетёсов, С.В. Онколитические вирусы: достижения и проблемы / С.В. Нетёсов, Г.В. Кочнева, В.А. Святченко и др. // Медицинский алфавит. — 2011. — 3 (13). — С. 10-17.
13. Пейдж, К.П. Фармакология: клинический подход, изд. 3-е / К.П. Пейдж, М.Дж. Кертис, М.Дж.А. Уокер и др., пер. с англ. Р. Бахтиярова и др. - Москва: Логосфера, 2012. — 731 с.
14. Соболев, И.А. Изменчивость вируса гриппа типа А / И.А. Соболев, О.Г.Курская, К.А. Шаршов и др. // Юг России: экология, развитие. — 2016. — 11 (1). С. 170-177. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2016-1-170-177>
15. Святченко, В.А. Конструирование перспективного онколитического вируса AD2DEL на основе генома аденовируса 2-го серотипа / В.А. Святченко, В.А. Терновой, Н.Н. Киселев и др. // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: биология, клиническая медицина. — 2003. — 11. - №3. — С. 70-77.
16. Чумаков, П.М. Онколитические нтеровирусы / П.М.Чумаков, В.В.Мороова, И.В.Бабкин и др. // Молекулярная биология. — 2012. —46 (5). — С. 712 – 725.
17. Шурыгина, А.-П.С. Онколитический потенциал рекомбинантных векторов вируса гриппа А на модели злокачественной глиомы *in vivo*/ А.-П.С. Шурыгина, А.В. Карташев, Е.Г. Кованько и др. // Вопросы онкологии. - 2016. — 62. - № 1. — С. 138-145.
18. Abu Bakar, S.A. Induction of apoptosis by Newcastle disease virus strains AF220 and V4-UPM in human promyelocytic leukemia (HL60) and human T-lymphoblastic leukemia (CEM-SS) cells / S.A. Abu Bakar, M. Zawawi, A.M. Ali et al. // World Academy of Science, Engineering and Technology. — 2012. — 64. — P. 395-399.
19. Abdullah, J.M. Newcastle disease virus interaction in targeted therapy against proliferation and invasion pathways of glioblastoma multiforme / J.M. Abdullah, Z. Mustafa, A. Ideris // Biomed Res Int. — 2014. — 2014. — P. 386470. doi: 10.1155/2014/386470.
20. Ahamed, T. Adaptation of Newcastle disease virus (NDV) on Vero cell line / T. Ahamed, K.M. Hossain, M.M. Billah et al. // International Journal of Poultry Science. — 2004. — 3 (2). — P. 153 - 156. doi: 10.3923/ijps.2004.153.156.
21. AL-Shammari, A.M. Molecular microarray study for the anti-angiogenic effect of Newcastle disease virus on glioblastoma tumor cells / A.M. AL-Shammari, Z.A. Al-Hilli, N.Y. Yaseen // Conference: Third International Scieitific Conference on Nanotechnology, Advanced Material and Their applications, At University of Technology, Baghdad, Iraq. - 2011. — 3. doi: 10.13140/2.1.4354.8481.

22. AL-Shammari, A.M. Iraqi Newcastle disease virus virulent strain as cancer antiangiogenic agent / A.M. AL-Shammari, Z.A. Al-Hilli, N.Y. Yaseen // *Molecular Therapy*. - 2013. - 21 (S1). - P. S247. doi: 10.1038/mt.2013.83.
23. Alexander, D.J. A technology review: Newcastle disease – with special emphasis on its effects on village chickens / D.J. Alexander, J.G. Bell, R.G. Alders. - Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. - 63 p.
24. Alexander, D.J. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009 / D.J. Alexander // *Avian Pathol.* – 2011. – 40 (6). – P. 547-558. doi: 10.1080/03079457.2011.618823.
25. Alexander, D.J. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirusinfections. Diseases of Poultry 12th edn / D.J. Alexander, D.A. Senne in Y.M. Saif et al. (Eds.). - Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2008. – P.74-115.
26. Altomonte, J. Engineered Newcastle disease virus as an improved oncolytic agent against hepatocellular carcinoma / J. Altomonte, S. Marozin, R.M. Schmid et al. // *Mol Ther.* – 2010. - 18 (2). – P. 275-284. doi: 10.1038/mt.2009.231.
27. Alvarez-Breckenridge, C.A. Uncovering a novel mechanism whereby NK cells interfere with glioblastoma virotherapy / C.A. Alvarez-Breckenridge, J. Yu, M.A. Caligiuri et al. // *Oncoimmunology*. – 2013. – 2 (4). - P. e23658. doi: 10.4161/onci.23658.
28. An, Y. Recombinant Newcastle disease virus expressing P53 demonstrates promising antitumor efficiency in hepatoma model / Y. An, T. Liu, J. He et al. // *J Biomed Sci.* – 2016. – 23 (1). – P. 55. doi: 10.1186/s12929-016-0273-0.
29. Andtbacka, R.H.I. Final data from CALM: A phase II study of Coxsackievirus A21 (CVA21) oncolytic virus immunotherapy in patients with advanced melanoma / R.H.I. Andtbacka, B.D. Curti, H. Kaufman et al. // *ASCO Meeting Abstracts*. – 2015. – 33. – P. 9030.
30. Angarita, F.A. Mounting a strategic offense: fighting tumor vasculature with oncolytic viruses / F.A. Angarita, S.A. Acuna, K. Ottolino-Perry et al. // *Trends Mol Med.* – 2013. – 19 (6). – P. 378-392. doi: 10.1016/j.molmed.2013.02.008.
31. Apostolidis, L. Host mediated anti-tumor effect of oncolytic Newcastle disease virus after locoregional application / L. Apostolidis, V. Schirmacher, P. Fournier // *Int J Oncol.* – 2007. - 31 (5). – P. 1009-1019. <https://doi.org/10.3892/ijo.31.5.1009>.
32. Arifin, M.A. Production of Newcastle disease virus by Vero cells grown on cytodex 1 microcarriers in a 2-litre stirred tank bioreactor / M.A. Arifin, M. Mel, M.I. Abdul Karim et al. // *J Biomed Biotechnol.* – 2010. – P. 586363. doi: 10.1155/2010/586363.
33. Asada, T. Treatment of human cancer with mumps virus / T. Asada // *Cancer.* – 1974. – 34 (6). – P. 1907-1928.

34. Atherton, M.J. Evolution of oncolytic viruses: novel strategies for cancer treatment / M.J. Atherton, B.D. Lichty // *Immunotherapy*. – 2013. – 5 (11). – P. 1191-1206. doi: 10.2217/imt.13.123.
35. Audet, S. Measles-virus-neutralizing antibodies in intravenous immunoglobulins / S. Audet, M.L. Virata-Theimer, J.A. Beeler et al. // *J Infect Dis*. – 2006. – 194 (6). – P. 781-789. doi.org/10.1086/506363.
36. Bai, F.L. Genetically engineered Newcastle disease virus expressing interleukin-2 and TNF-related apoptosis-inducing ligand for cancer therapy / F.L. Bai, Y.H. Yu, H. Tian et al. // *Cancer Biol Ther*. – 2014. – 15 (9). – P. 1226-1238. doi: 10.4161/cbt.29686.
37. Baig, S. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? / S. Baig, I. Seevasant, J. Mohamad et al. // *Cell Death Dis*. – 2016. – 7. – P. e2058. doi: 10.1038/cddis.2015.275.
38. Bartsch, R. Activity of T-DM1 in Her2-positive breast cancer brain metastases / R. Bartsch, A.S. Berghoff, U. Vogl et al. // *Clin Exp Metastasis*. – 2015. – 32 (7). – P. 729-737. doi: 10.1007/s10585-015-9740-3.
39. Battisti, A.J. Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein / A.J. Battisti, G. Meng, D.C. Winkler et al. // *Proc Natl AcadSci USA*. – 2012. – 109 (35). – P. 13996-14000. doi: 10.1073/pnas.1210275109.
40. Berkrot, B. FDA approves Amgen's injected immunotherapy for melanoma [Электронный ресурс] / Reuters. – 2015. – Режим доступа: <https://www.reuters.com/article/us-amgen-fda/fda-approves-amgens-injected-immunotherapy-for-melanoma-idUSKCN0SL2YH20151027>.
41. Bernt, K.M. The effect of sequestration by nontarget tissues on anti-tumor efficacy of systemically applied, conditionally replicating adenovirus vectors / K.M. Bernt, S. Ni, A. Gaggar et al. // *Mol Ther*. – 2003. – 8. – P. 746-755. doi: 10.1016/j.ymthe.2003.07.006.
42. Bian, J. Caspase- and p38-MAPK-dependent induction of apoptosis in A549 lung cancer cells by Newcastle disease virus / J. Bian, K. Wang, X. Kong et al. // *Arch Virol*. – 2011. – 156 (8). – P. 1335-1344. doi: 10.1007/s00705-011-0987-y.
43. Bohle, W. Postoperative active specific immunization in colorectal cancer patients with virus-modified autologous tumor-cell vaccine. First clinical results with tumor-cell vaccines modified with live but avirulent Newcastle disease virus / W. Bohle, P. Schlag, W. Liebrich et al. // *Cancer*. – 1990. – 66 (7). – P. 1517 - 1523.
44. Bota, D.A. Proteasome inhibition with bortezomib induces cell death in GBM stem-like cells and temozolomide-resistant glioma cell lines, but stimulates GBM stem-like cells' VEGF production and angiogenesis / D.A. Bota, D. Alexandru, S.T. Keir et al. // *J Neurosurg*. – 2013. – 119 (6). – P. 1415-1423. doi: 10.3171/2013.7.JNS1323.

45. Bottsford-Miller, J.N. Resistance and escape from antiangiogenesis therapy: clinical implications and future strategies / J.N. Bottsford-Miller, R.L. Coleman, A.K. Sood // *J Clin Oncol.* – 2012. – 30 (32). – P. 4026-4034. doi: 10.1200/JCO.2012.41.9242.
46. Brahmer, J.R. Health-related quality-of-life results for pembrolizumab versus chemotherapy in advanced, PD-L1-positive NSCLC (KEYNOTE-024): a multicentre, international, randomised, open-label phase 3 trial / J.R. Brahmer, D. Rodríguez-Abreu, A.G. Robinson et al. // *Lancet Oncol.* – 2017. – 18 (12). – P. 1600-1609. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30690-3.
47. Breitbach, C.J. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans / C.J. Breitbach, R. Arulanandam, N. De Silva et al. // *Cancer Res.* – 2013. – 73 (4). – P. 1265-1275. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2687.
48. Breitbach, C.J. Pexa-Vec double agent engineered vaccinia: oncolytic and active immunotherapeutic / C.J. Breitbach, K. Parato, J. Burke et al. // *Curr Opin Virol.* – 2015. – 13. – P. 49-54. doi: 10.1016/j.coviro.2015.03.016.
49. Breitbach, C.J. Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus / C.J. Breitbach, N.S. De Silva, T.J. Falls et al. // *Mol Ther.* – 2011. – 19 (5). P. 886-894. doi: 10.1038/mt.2011.26.
50. Buijs, P.R. Intravenously injected Newcastle disease virus in non-human primates is safe to use for oncolytic virotherapy / P.R. Buijs, G. van Amerongen, S. van Nieuwkoop et al. // *Cancer Gene Ther.* – 2014. – 21 (11). – P. 463 - 471. doi: 10.1038/cgt.2014.51.
51. Byrnes, A.P. Large-plaque mutants of Sindbis virus show reduced binding to heparin sulfate, heightened viremia, and slower clearance from the circulation / A.P. Byrnes, D.E. Griffin // *J Virol.* – 2000. – 74 (2). – P. 644-651.
52. Cassel, W.A. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent / W.A. Cassel, R.E. Garrett // *Cancer.* – 1965. – 18. – P. 863-868.
53. Chen, N. Poxvirus interleukin-4 expression overcomes inherent resistance and vaccine-induced immunity: pathogenesis, prophylaxis, and antiviral therapy / N. Chen, C.J. Bellone, J. Schriewer et al. // *Virology.* – 2011. – 409 (2). – P. 328-337. doi: 10.1016/j.virol.2010.10.021.
54. Chen, S. CRISPR-Cas9: from genome editing to cancer research / Chen S., Sun H., Miao K. et al. // *Int J Biol Sci.* – 2016. – 12 (12). – P. 1427-1436. doi: 10.7150/ijbs.17421.
55. Ch'ng, W.C. The oncolytic activity of Newcastle disease virus in clear cell renal carcinoma cells in normoxic and hypoxic conditions: the interplay between von Hippel-Lindau and Interferon- β signaling / W.C. Ch'ng, E.J. Stanbridge, K. Yusoff et al. // *J Interferon Cytokine Res.* – 2013. – 33 (7). – P. 346–354. doi: 10.1089/jir.2012.0095.
56. Chiocca, E.A. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy / E.A. Chiocca, S.D. Rabkin // *Cancer Immunol Res.* – 2014. – 2 (4). – P. 295-300. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0015.

57. Chung, E.H. Vaccine allergies / E.H. Chung // *Clin Exp Vaccine Res.* – 2014. – 3 (1). – P. 50 - 57. doi: 10.7774/cevr.2014.3.1.50.
58. Claudinon, J. Palmitoylation of interferon-alpha (IFN-alpha) receptor subunit IFNAR1 is required for the activation of Stat1 and Stat2 by IFN-alpha / J. Claudinon, P. Gonnord, E. Beslard et al. // *J Biol Chem.* – 2009. – 284 (36). – P. 24328-24340.
59. Cockle, J.V. What is oncolytic virotherapy? / J.V. Cockle, K.J. Scott // *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* – 2018. – 103 (1). – P. 43 - 45. doi: 10.1136/archdischild-2016-311922.
60. Comins, C. REO-10: a phase I study of intravenous reovirus and docetaxel in patients with advanced cancer / C. Comins, J. Spicer, A. Protheroe et al. // *Clin Cancer Res.* – 2010. – 16 (22). – P. 5564-5572. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1233.
61. Connor, J.H. Replication and cytopathic effect of oncolytic vesicular stomatitis virus in hypoxic tumor cells in vitro and in vivo / J.H. Connor, C. Naczki, C. Koumenis et al. // *J Virol.* – 2004. – 78 (17). – P. 8960-8970. doi: 10.1128/JVI.78.17.8960-8970.2004.
62. Corbin, A.S. Human chronic myeloid leukemia stem cells are in sensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity / A.S. Corbin, A. Agarwal, M. Loriaux et al. // *J Clin Invest.* – 2011. – 121 (1). – P. 396-409. doi: 10.1172/JCI35721.
63. Coulson, A. Monoclonal antibodies in cancer therapy: mechanisms, successes and limitations / A. Coulson, A. Levy, M. Gossell-Williams // *West Indian Med J.* – 2014. – 63 (6). –P. 650-654. doi: 10.7727/wimj.2013.241.
64. Csatory, L.K. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas / L.K. Csatory, G. Gosztonyi, J. Szeberenyi et al. // *J Neurooncol.* – 2004. - 67 (1-2). – P. 83 - 93.
65. Csatory, L.K. Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) / L.K. Csatory, R.W. Moss, J. Beuth et al. // *Anticancer Res.* – 1999. - 19 (1B). – P. 635 - 638.
66. Cuadrado-Castano, S. Enhancement of the proapoptotic properties of newcastle disease virus promotes tumor remission in syngeneic murine cancer models / S. Cuadrado-Castano, J. Ayllon, M. Mansour et al. // *Mol Cancer Ther.* - 2015. – 14 (5). – P. 1247-1258. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0913.
67. CyberKnife® Robotic Radiosurgery System [Электронныйресурс] / CyberKnife. – 2018. - Режимдоступа: <http://www.cyberknife.com/>.
68. Cyranoski, D. CRISPR gene editing tested in a person / D. Cyranoski // *Nature.* – 2016. - 539. – P. 479.
69. den Hollander, P. Targeted therapy for breast cancer prevention / P. den Hollander, M.I. Savage, P.H. Brown // *Front Oncol.* – 2013. – 3. – P. 250. doi: 10.3389/fonc.2013.00250.

70. Diel, D.G. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes / D.G. Diel, L.H. da Silva, H. Liu et al. // *Infect Genet Evol.* – 2012. – 12. – P. 1770 – 1779. doi: 10.1016/j.meegid.2012.07.012.
71. DNATRIX Inc. DNX-2401 (Formerly Known as Delta-24-RGD-4C) for Recurrent Malignant Gliomas. NLM Identifier: NCT00805376. [Электронный ресурс] / *ClinicalTrials.gov.* – 2018. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00805376>.
72. DNATRIX Inc. DNX-2401 With Interferon Gamma (IFN- γ) for Recurrent Glioblastoma or Gliosarcoma Brain Tumors (TARGET-I). NLM Identifier: NCT02197169. [Электронный ресурс] / *ClinicalTrials.gov.* – 2018a. – Режим доступа: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02197169?term=dnatrix&rank=1>.
73. DNATRIX Inc. Virus DNX2401 and Temozolomide in Recurrent Glioblastoma (D24GBM). NLM Identifier: NCT01956734. [Электронный ресурс] / *ClinicalTrials.gov.* – 2018b. – Режим доступа: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01956734?term=dnatrix&rank=3>.
74. Dobardzic, A. Safety review of the purified chick embryo cell rabies vaccine: Data from the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), 1997-2005 / A. Dobardzic, H. Izurieta, E.J. Woo et al. // *Vaccine.* – 2007. – 25 (21). – P. 4244 - 4251. doi:<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.075>.
75. Donis Canet, F. Cryotherapy versus high-intensity focused ultrasound for treating prostate cancer: Oncological and functional results / F. Donis Canet, M.D. Sánchez Gallego, F. Arias Fúnez et al. // *Actas Urol Esp.* – 2017. - pii: S0210-4806(17)30156-0. doi: 10.1016/j.acuro.2017.06.005.
76. Dortmans, J.C. Passaging of a Newcastle disease virus pigeon variant in chickens result in selection of viruses with mutations in the polymerase complex enhancing replication and virulence / J.C. Dortmans, P.J. Rottier, G. Koch et al. // *J Gen Virol.* – 2011. – 92 (Pt.2). – P. 336-345. doi: 10.1099/vir.0.026344-0.
77. Dortmans, J.C. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? / J.C. Dortmans, G. Koch, P.J. Rottier et al. // *Vet Res.* – 2011a. – 42. – P. 122. doi: 10.1186/1297-9716-42-122.
78. Elankumaran, S. Type I interferon-sensitive recombinant newcastle disease virus for oncolytic virotherapy / S. Elankumaran, V. Chavan, D. Qiao et al. // *J Virol.* – 2010. – 84 (8). – P. 3835-3844. doi: 10.1128/JVI.01553-09.
79. Elankumaran, S. Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death / S. Elankumaran, D. Rockemann, S.K. Samal // *J Virol.* – 2006. – 80 (15). – P.7522 -7534.
80. Escalante, C.P. Meta-analysis of cardiovascular toxicity risks in cancer patients on selected targeted agents / C.P. Escalante, Y.C. Chang, K. Liao et al. // *Support Care Cancer.* – 2016. – 24(9). – P. 4057-4074. doi: 10.1007/s00520-016-3310-3.

81. Evans, A.S. Pathogenicity and immunology of Newcastle disease virus (NDV) in man / A.S. Evans // *Am J Public Nations Health*. – 1955. – 45 (6). – P. 742-745.
82. Fabian, Z. p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines / Z. Fabian, C.M. Csatory, J. Szeberenyi et al.// *J Virol*. – 2007. – 81. – P. 2817–2830. doi: 10.1128/JVI.02490-06.
83. FAD PReP. Newcastle disease standard operating procedures: 1. Overview of etiology and ecology. National Preparedness and Incident Coordination, Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture [Электронный ресурс] / FADPReP, USDA. – 2013. – Режим доступа: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergency_management/downloads/sop/sop_nd_e-e.pdf.
84. Falcon, B.L. Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents / B.L. Falcon, S. Chintharlapalli, M.T. Uhlik et al. // *Pharmacol Ther.* – 2016. – 164. – P. 204-225. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.06.001.
85. Firnhaber, C. Cryotherapy reduces progression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1 in South African HIV-infected women: a randomized, controlled trial / C. Firnhaber, A. Swarts, B. Goeieman et al. // *J Acquir Immune Defic Syndr.* – 2017. – 76 (5). – P. 532-538. doi: 10.1097/QAI.0000000000001539.
86. Fisher, K.D. Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies / K.D. Fisher, Y. Stallwood, N.K. Green et al. // *Gene Ther.* – 2001. – 8 (5). – P. 341-348.
87. Fournier, P. Analysis of three properties of Newcastle disease virus for fighting cancer: tumor-selective replication, antitumor cytotoxicity, and immunostimulation / P. Fournier, H. Bian, J. Szeberényi et al. // *Methods Mol Biol.* - 2012. – 797. – P. 177-204. doi: 10.1007/978-1-61779-340-0_13.
88. Fournier, P. Oncolytic Newcastle disease virus as cutting edge between tumor and host / P. Fournier, V. Schirmmacher // *Biology (Basel)*. – 2013. – 2 (3). – P. 936-975. doi: 10.3390/biology2030936.
89. Frank, S.J. Prospective Phase 2 Trial of permanent seed implantation prostate brachytherapy for intermediate-risk localized prostate cancer: efficacy, toxicity, and quality of life outcomes / S.J. Frank, T.J. Pugh, P. Blanchard et al. // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2018. – 100 (2). – P. 374-382. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.09.050.
90. Friedman, H.S. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma / H.S. Friedman, M.D. Prados, P.Y. Wen, // *J Clin Oncol.* – 2009. – 27 (28). – P. 4733-4740. doi: 10.1200/JCO.2008.19.8721.

91. Galanis, E. Phase II Trial of Intravenous Administration of Reolysin[®] (Reovirus Serotype-3-dearing Strain) in Patients with Metastatic Melanoma / E. Galanis, S.N. Markovic, V.J. Suman et al. // *Mol Ther.* – 2012. – 20 (10). – P. 1998–2003. doi: 10.1038/mt.2012.146.
92. Galatin, P.S. Phase I trial of oblimersen (Genasense[®]) and gemcitabine in refractory and advanced malignancies / P.S. Galatin, R.H. Advani, G.A. Fisher et al. // *Invest New Drugs.* – 2011. – 29 (5). – P. 971-977. doi: 10.1007/s10637-010-9416-4.
93. Gallick, G.E. Small-molecule protein tyrosine kinase inhibitors for the treatment of metastatic prostate cancer / G.E. Gallick, P.G. Corn, A.J. Zurita et al. // *Future Med Chem.* – 2012. – 4 (1). – P. 107-119. doi: 10.4155/fmc.11.161.
94. Galluzzi, L. Classification of current anticancer immunotherapies / L. Galluzzi, E. Vacchelli, J.M. Bravo-San Pedro et al. // *Oncotarget.* – 2014. – 5 (24). – P. 12472-12508. doi: 10.18632/oncotarget.2998.
95. Galluzzi, L. Programmed necrosis: from molecules to health and disease / L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, N. Vanlangenakker et al. // *Int Rev Cell Mol Biol.* – 2011. – 289. – P. 1-35. doi: 10.1016/B978-0-12-386039-2.00001-8.
96. Galluzzi, L. Molecular definition of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 / L. Galluzzi, I. Vitale, J.M. Abrams et al. // *Cell Death Differ.* – 2012. – 19 (1). – P. 107-120. doi: 10.1038/cdd.2011.96.
97. Ganar, K. Newcastle disease virus: current status and our understanding / K. Ganar, M. Das, S. Sinha et al. // *Virus Res.* – 2014. – 184. – P. 71-81. doi: 10.1016/j.virusres.2014.02.016.
98. Garber, K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment / K. Garber // *J Natl Cancer Inst.* – 2006. – 98 (5). – P. 298-300. doi: 10.1093/jnci/djj111.
99. Ghrici, M. Newcastle disease virus Malaysian strain AF2240 induces apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells at an early stage of the virus life cycle / M. Ghrici, M. El Zowalaty, A.R. Omar et al. // *Int J Mol Med.* – 2013. – 31 (3). – P. 525-532. doi: 10.3892/ijmm.2013.1244.
100. Gingras, D. AE-941 (Neovastat): a novel multifunctional antiangiogenic compound / D. Gingras, G. Batist, R. Béliveau // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2001. – 1 (3). – P. 341-347. doi:10.1586/14737140.1.3.341.
101. Goebel, S.J. Isolation of avian paramyxovirus 1 from patient with a lethal case of pneumonia / S.J. Goebel, J. Taylor, B.C. Barr et al. // *J Virol.* – 2007. – 81 (22). – P. 12709-12714. doi: 10.1128/JVI.01406-07.
102. Goldar, S. / S. Goldar, M.S. Khaniani, S.M. Derakhshan et al. // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2015. – 16 (6). – P. 2129 - 2144. doi:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.6.2129
103. Gonzalez-Perez, R.R. Tumor Angiogenesis Regulators / R.R. Gonzalez-Perez, B.R. Rueda. - Boston, USA: CRC Press Reference, 2013. – 462 p.

104. Grimes, S. E. A basic laboratory manual for the small scale production and testing of II-2 Newcastle disease vaccine, Food and Agricultural Organization (FAO), Animal Production and Health Commission for Asia and the Pacific (APHCA) / S.E. Grimes. – Bangkok: FAO-APHCA, 2002. – 139 p.
105. Grohskopf, L.A. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) - United States, 2016-17 influenza season / L.A. Grohskopf, L.Z. Sokolow, K.R. Broder et al. // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2016. – 65 (RR-5). – P. 1 - 54. doi: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6505a1>.
106. Guo, Z.S. Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity / Z.S Guo, Z. Liu, D.L. Bartlett // *Front Oncol.* – 2014. – 4. – P. 74. doi: 10.3389/fonc.2014.00074.
107. Haas, C. Introduction of adhesive and costimulatory immune functions into tumor cells by infection with Newcastle disease virus / C. Haas, C. Ertel, R. Gerhards et al. // *Int J Oncol.* – 1998. – 13 (6). – P. 1105-1115.
108. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – 144 (5). – P. 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
109. Harrington, K.J. Two-stage phase I dose-escalation study of intratumoral reovirus type 3 dearing and palliative radiotherapy in patients with advanced cancers / K.J. Harrington, E.M. Karapanagiotou, V. Roulstone et al. // *Clin Cancer Res.* – 2010. – 16 (11). – P. 3067-3077. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0054.
110. Harrison, M.S. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections / M.S. Harrison, T. Sakaguchi, A.P. Schmitt // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2010. – 42 (9). – P. 1416-1429. doi: 10.1016/j.biocel.2010.04.005.
111. Heiden, S. Pigeon paramyxovirus type 1 variants with polybasic F protein cleavagesite but strikingly different pathogenicity / S. Heiden, C. Grund, D. Höper et al. // *Virus Genes.* – 2014. – 49 (3). – P. 502–506. doi: 10.1007/s11262-014-1111-7.
112. Heo, J. Sequential therapy with JX-594, a targeted oncolytic poxvirus, followed by sorafenib in hepatocellular carcinoma: preclinical and clinical demonstration of combination efficacy / J. Heo, C.J. Breitbach, A. Moon et al. // *Mol. Ther.* – 2011. – 19 (6). – P. 1170–1179. doi: 10.1038/mt.2011.39.
113. Heo, J. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer / J. Heo, T. Reid, L. Ruo et al. // *Nat Med.* – 2012. – 19. – P. 329-336. doi:10.1038/nm.3089.

114. Hoster H.A. Studies in Hodgkin's syndrome; the association of viral hepatitis and Hodgkin's disease; a preliminary report / H.A. Hoster, R.P.Jr. Zanes, E. Von Haam // *Cancer Res.* – 1949. – 9 (8). – P. 473-480.
115. Hou, W. Oncolytic vaccinia virus demonstrates antiangiogenic effects mediated by targeting of VEGF / W. Hou, H. Chen, J. Rojas et al. // *Int J Cancer.* – 2014. – 135 (5). – P. 1238-1246. doi: 10.1002/ijc.28747.
116. Huang, T.T. Intravenous administration of retroviral replicating vector, Toca 511, demonstrates therapeutic efficacy in orthotopic immune-competent mouse glioma model / T.T. Huang, S. Parab, R. Burnett et al. // *Hum Gene Ther.* – 2015. – 26 (2). – P. 82-93. doi: 10.1089/hum.2014.100.
117. Huang, Y. Y. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene / Huang, H.Q. Wan, H.Q. Liu et al. // *Arch Virol.* – 2004. – 149. – P. 1445 – 1457. doi: 10.1007/s00705-004-0297-8.
118. Huang, Z. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist / Z. Huang, S. Krishnamurthy, A. Panda et al. // *J Virol.* – 2003. – 77 (16). – P. 8676-8685. doi: 10.1128/JVI.77.16.8676–8685.2003.
119. Hughes, T. The prognostic significance of stable disease following high-dose interleukin-2 (IL-2) treatment in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma / T. Hughes, M. Klairmont, J. Broucek et al. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2015. – 64 (4). - P. 459-465. doi: 10.1007/s00262-014-1652-6.
120. Hwang, I.I. Loss of VHL confers hypoxia-inducible factor (HIF)-dependent resistance to vesicular stomatitis virus: role of HIF in antiviral response / I.I. Hwang, I.R. Watson, S.D. Der et al. // *J Virol.* – 2006. – 80 (21). – P. 10712-10723. doi: 10.1128/JVI.01014-06.
121. Ikeda, K. Complement depletion facilitates the infection of multiple brain tumors by an intravascular, replication-conditional herpes simplex virus mutant / K. Ikeda, H. Wakimoto, T. Ichikawa et al. // *J Virol.* - 2000. – 74 (10). – P. 4765-4775.
122. Ikeda, Y. A novel antiangiogenic effect for telomerase-specific virotherapy through host immune system / Y. Ikeda, T. Kojima, S. Kuroda et al. // *J Immunol.* – 2009. – 182 (3). – P. 1763-1769. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1763>.
123. IMLYGIC™ (talimogene laherparepvec), BioVex, Inc., a subsidiary of Amgen Inc. [Электронный ресурс] / AmgenInc. – 2018. - Режим доступа: <http://www.imlygic.com/>.
124. Janke, M. Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy / M. Janke, B. Peeters, O. de Leeuw et al. // *Gene Ther.* – 2007. – 14 (23). – P. 1639-1649. doi:10.1038/sj.gt.3303026.

125. Janke, M. Activation of human T cells by a tumor vaccine infected with recombinant Newcastle disease virusproducing IL-2 / M. Janke, B. Peeters, H. Zhao et al. // *Int J Oncol.* – 2008. – 33 (4). – P. 823-832. doi: 10.3892/ijo_00000070.
126. Jarahian, M. Activation of natural killer cells by Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase / M. Jarahian, C. Watzl, P. Fournier et al. // *J Virol.* – 2009. – 83 (16). – P. 8108 - 8121. doi: 10.1128/JVI.00211-09.
127. Jazirehi, A.R. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy / A.R. Jazirehi, M.I. Vega, B. Bonavida et al. // *Cancer Res.* – 2007. – 67 (3). – P. 1270-1281. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2184.
128. Jiang, B.S. Immunotherapy following regional chemotherapy treatment of advanced extremity melanoma / B.S. Jiang, G.M. Beasley, P.J. Speicher et al. // *AnnSurgOncol.* – 2014. – 21 (8). – P. 2525-2531. doi: 10.1245/s10434-014-3671-0.
129. Jiang, K. Pharmacological modulation of autophagy enhances Newcastle disease virus-mediated oncolysis in drug-resistant lung cancer cells / K. Jiang, Y. Li, Q. Zhu et al. // *BMC Cancer.* – 2014a. – 14. - P. 551. doi: 10.1186/1471-2407-14-551.
130. Johnson, D.B. Talimogene laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma / D.B. Johnson, I. Puzanov, M.C. Kelley // *Immunotherapy.* – 2015. – 7 (6). – P. 611-619. doi: 10.2217/imt.15.35.
131. Jirillo, E. Hepatitis C virus disease: immunobiology and clinical applications / E. Jirillo. - New-York, USA: Springer-Verlag New York, 2008. - 306 p.
132. Kelly, E. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering / E. Kelly, S.J. Russell // *Mol Ther.* - 2007. – 15 (4). – P. 651-659. doi:10.1038/mt.sj.6300108.
133. Kim, L.M. Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-organ isolates / Kim L.M., King D.J., P.E. Curry et al. // *J Virol.* – 2007. – 81. – P. 12641 – 12653. doi: 10.1128/JVI.00843-07.
134. Kim, L.M. Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus cserotype 1 Circulating in wild North American pigeons and doves / Kim L.M., King D.J., Guzman H. et al. // *J Clin Microbiol.* – 2008. – 46 (10). – P. 3303–3310. doi: 10.1128/JCM.00644-08.
135. Kim, S.H. Roles of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in replication, tropism, and pathogenicity of avian paramyxoviruses / S.H. Kim, M. Subbiah, A.S. Samuel et al. // *J Virol.* – 2011. – 85 (17). – P. 8582-8596. doi: 10.1128/JVI.00652-11.

136. Kirn, D.H. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus / Kirn D.H., Wang Y., Le Boeuf F. et al. // *PLoS Med.* – 2007. – 4 (12). – P. e353. doi: 10.1371/journal.pmed.0040353.
137. Kodani, N. Stereotactic body radiation therapy for head and neck tumor: disease control and morbidity outcomes / N. Kodani, H. Yamazaki, T. Tsubokura et al. // *J Radiat Res.* – 2011. – 52 (1). – P. 24-31. doi:10.1269/jrr.10086.
138. Koks, C.A. Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death / C.A. Koks, A.D. Garg, M. Ehrhardt et al. // *Int J Cancer.* – 2015 – 136 (5). – P. E313-325. doi: 10.1002/ijc.29202.
139. Kottke, T. Antiangiogenic cancer therapy combined with oncolytic virotherapy leads to regression of established tumors in mice / T. Kottke, G. Hall, J. Pulido et al. // *J Clin Invest.* – 2010. – 120 (5). – P. 1551-1560. doi: 10.1172/JCI41431.
140. Krasilnikova, A.A. Prospects of molybdenum and rhenium octahedral cluster complexes as X-ray contrast agents / A.A. Krasilnikova, M.A. Shestopalov, K.A. Brylev et al. // *J Inorg Biochem.* – 2015. – 144. – P. 13-17. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.12.016.
141. Krishnamurthy, S. Differentially regulated interferon response determines the outcome of Newcastle disease virus infection in normal and tumor cell lines / S. Krishnamurthy, T. Takimoto, R.A. Scroggs et al. // *J Virol.* – 2006. – 80 (11). – P. 5145-5155. doi: 10.1128/JVI.02618-05.
142. Kristensen, T.B. Anti-vascular endothelial growth factor therapy in breast cancer / T.B. Kristensen, M.L. Knutsson, M. Wehland et al. // *Int J Mol Sci.* - 2014. – 15 (12). - P. 23024–23041. doi: 10.3390/ijms151223024.
143. Kudchodkar, S.B. Viruses and autophagy / S.B. Kudchodkar, B. Levine // *Rev Med Virol.* – 2009. – 19 (6). – P. 359-378. doi: 10.1002/rmv.630.
144. Kumar, A. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF- κ B by phosphorylating I κ B / Kumar A., Haque J., Lacoste J. et al. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1994. – 91 (14). – P. 6288-6292.
145. Kumar, R. Velogenic Newcastle disease virus as an oncolytic virotherapeutics: In vitro characterization / R. Kumar, A.K. Tiwari, U. Chaturvedi et al. // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2012. – 167. – P. 2005 - 2022. doi:10.1007/s12010-012-9700-1.
146. Labanaris, A. HistoScanning: a new diagnostic modality for the detection, localtion and tumour volume determination of prostate cancer / A. Labanaris, A. Eck, M. Addali et al. // *Eur Urol Suppl.* – 2012. – 11. - S141 (abs.S.38).

147. Lam, H.Y. Safety and clinical usage of Newcastle disease virus in cancer therapy / H.Y. Lam, S.K. Yeap, M. Rasoli et al. // *J Biomed Biotechnol.* – 2011. – 2011. – P. 718710. doi: 10.1155/2011/718710.
148. Lang, F.F. Phase I clinical trial of oncolytic virus Delta-24-RGD (DNX-2401) with biological endpoints: implications for viro-immunotherapy / F.F. Lang, C. Conrad, C. Gomez-Manzano et al. // *Neuro Oncol.* – 2014. – 16 (suppl 5). – P. v162. doi: 10.1093/neuonc/nou265.17.
149. Laurie, S.A. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization / S.A. Laurie, J.C. Bell, H.L. Atkins et al. // *Clin Cancer Res.* – 2006. – 12 (8). – P. 2555 - 2562. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2038.
150. Lee, P. A single mutation in the E2 glycoprotein important for neurovirulence influences binding of sindbis virus to neuroblastoma cells / P. Lee, R. Knight, J.M Smit. et al. // *J Virol.* – 2002. – 76 (12). – P. 6302-6310. doi: 10.1128/JVI.76.12.6302-6310.2002.
151. Li, P. Therapeutic effects of a fusogenic Newcastle disease virus in treating head and neck cancer / P. Li, C.H. Chen, S. Li et al. // *Head Neck.* – 2011. – 33 (10). – P. 1394-1399. doi: 10.1002/hed.21609.
152. Li, Y. Key points of basic theories and clinical practice in rAd-p53 (Gendicine™) gene therapy for solid malignant tumors / Y. Li, B. Li, C.J. Li et al. // *Expert Opin Biol Ther.* – 2015. – 15 (3). – P. 437-454. doi: 10.1517/14712598.2015.990882.
153. Li, C. Optimizing the treatment of bevacizumab as first-line therapy for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative advanced breast cancer: an updated meta-analysis of published randomized trials / C. Li, A. Xiang, X. Chen et al. // *OncoTargetsTher.* – 2017. – 10. – P. 3155-3168. doi: 10.2147/OTT.S138600.
154. Lichty, B.D. Going viral with cancer immunotherapy / B.D. Lichty, C.J. Breitbach, D.F. Stojdl et al. // *Nat Rev Cancer.* – 2014. – 14 (8). – P. 559-567. doi: 10.1038/nrc3770.
155. Lipson, E.J. Safety and immunologic correlates of Melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting / E.J. Lipson, W.H. Sharfman, S. Chen et al. // *J Transl Med.* – 2015. – 13. – P. 214. doi: 10.1186/s12967-015-0572-3.
156. Liu, X. Surveillance for avirulent Newcastle disease viruses in domestic ducks (*Anas platyrhynchos* and *Cairina moschata*) at live bird markets in eastern China and characterization of the viruses isolated / X. Liu, X. Wang, S. Wu et al. // *Avian Pathol.* – 2009. – 38. – P. 377 – 391. doi: 10.1080/03079450903183637.
157. Liu, X.F. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during

- 1985-2001 / X.F. Liu, H.Q. Wang, X.X. Ni et al. // *Arch Virol.* – 2003. – 148. – P. 1387 – 1403. doi: 10.1007/s00705-003-0014-z.
158. Lorence, R.M. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity / R.M. Lorence, P.A. Rood, K.W. Kelley // *J Natl Cancer Inst.* – 1988. – 80 (16). – P. 1305-1312.
159. Lu, D. Population pharmacokinetics of trastuzumab emtansine (T-DM1), a HER2-targeted antibody-drug conjugate, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer: clinical implications of the effect of covariates / D. Lu, S. Girish, Y. Gao et al. // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2014. – 74 (2). – P. 399-410. doi: 10.1007/s00280-014-2500-2. 10.1007/s00280-014-2500-2.
160. Lu, W. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial / W. Lu, S. Zheng, X.F. Li et al. // *World J Gastroenterol.* – 2004. – 10 (24). – P. 3634-3638. doi: 10.3748/wjg.v10.i24.3634.
161. Luo, Y. Development of an HSV-1 neutralization test with a glycoprotein D specific antibody for measurement of neutralizing antibody titer in human sera / Y. Luo, D. Xiong, H.H. Li et al. // *Virology*. – 2016. – 13. – P. 44. doi: 10.1186/s12985-016-0508-4.
162. Macpherson, L.W. Some observations on the epizootiology of Newcastle disease / L.W. Macpherson // *Can J Comp Med Vet Sci.* – 1956. – 20 (5). – P. 155-168.
163. Maloney, E. Emerging HIFU applications in cancer therapy / E. Maloney, J.H. Hwang // *Int J Hyperthermia.* – 2015. – 31 (3). – P. 302-309. doi: 10.3109/02656736.2014.969789.
164. Molouki, A. The matrix (M) protein of Newcastle disease virus binds to human bax through its BH3 domain / A. Molouki, Y.T. Hsu, F. Jahanshahi et al. // *Virology*. – 2011. – 8. – P. 385. doi: 10.1186/1743-422X-8-385.
165. Molouki, A. The matrix (M) protein of Newcastle disease virus binds to human bax through its BH3 domain / A. Molouki, K. Yusoff // *Virology*. – 2012. – 9. – P. 179. doi: 10.1186/1743-422X-9-179..
166. Mansour, M. Oncolytic specificity of Newcastle disease virus is mediated by selectivity for apoptosis-resistant cells / M. Mansour, P. Palese, D. Zamarin // *J Virol.* – 2011. – 85 (12). – P. 6015-6023. doi: 10.1128/JVI.01537-10.
167. Matthews, J.T. Egg-Based Production of Influenza Vaccine: 30 Years of Commercial Experience / J.T. Matthews // *The Bridge.* – 2006. – 36 (3). – P. 17 - 24.
168. Maude, S.L. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia / S.L. Maude, T.W. Laetsch, J. Buechner et al. // *N Engl J Med.* – 2018. – 378 (5). – P. 439-448. doi: 10.1056/NEJMoa1709866.

169. Mayo, M.A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV / M.A. Mayo // *Arch Virol.* – 2002. – 147 (8). – P. 1655-1663.
170. McLean, H.Q. Prevention of measles, rubella, congenital rubella syndrome, and mumps, 2013: summary recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) / H.Q. McLean, A.P. Fiebelkorn, J.L. Temte et al. // *MMWR Recomm Rep.* – 2013. – 62 (RR-04). – P. 1 - 34.
171. Mebatsion, T. A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos / T. Mebatsion, S. Verstegen, L.T. De Vaan et al. // *J Virol.* – 2001. – 75 (1). – P. 420-428. doi: 10.1128/JVI.75.1.420-428.2001.
172. Meng, G. Mitophagy promotes replication of oncolytic Newcastle disease virus by blocking intrinsic apoptosis in lung cancer cells / G. Meng, M. Xia, D. Wang et al. // *Oncotarget.* – 2014. – 5 (15). – P. 6365-6374. doi: 10.18632/oncotarget.2219.
173. Meng, C. Newcastle disease virus triggers autophagy in U251 glioma cells to enhance virus replication / C. Meng, Z. Zhou, K. Jiang et al. // *Arch Virol.* – 2012. – 157 (6). – P. 1011-1018. doi: 10.1007/s00705-012-1270-6.
174. Mia Kim, L. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay / L. Mia Kim, D.L. Suarez, C.L. Afonso // *J. Vet Diagn Invest.* – 2008. – 20 (4). – P. 414-425. doi: 10.1177/104063870802000402.
175. Miller, P.J. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges / P.J. Miller, E.L. Decanini, C.L. Afonso // *Infect Genet Evol.* - 2010. – 10. – P. 26 – 35. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.012.
176. Misiakos, E.P. Cytopathologic diagnosis of fineneedle aspiration biopsies of thyroid nodules / E.P. Misiakos, N. Margari, C. Meristoudis et al. // *A World J ClinCases.* – 2016. – 4 (2). – P. 38-48. doi: 10.12998/wjcc.v4.i2.38.
177. Moore, A.E. Influence of hemagglutinating viruses on tumor cell suspensions. II. Newcastle disease virus and Ehrlich carcinoma / A.E. Moore, L.C. Diamond, H.H. Mackay et al. // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1952. – 81920. – P. 498-501.
178. Moore, A.E. Effects of viruses on tumors / A.E. Moore // *Annu Rev Microbiol.* – 1954. – 8. – P. 393 – 410.
179. Moreno Nogueira, J.A. Adjuvant treatment of melanoma / J.A. Moreno Nogueira, M. Valero Arbizu, R. Pérez Temprano // *ISRN Dermatol.* – 2013. – 2013. – P. 545631. doi: 10.1155/2013/545631.

180. Molouki, A. The matrix (M) protein of Newcastle disease virus binds to human Bax through its BH3 domain / A. Molouki, Y.T. Hsu, F. Jahanshiri et al. // *Virology*. – 2011. – 8. – P. 385. doi: 10.1186/1743-422X-8-385.
181. Molouki, A. NDV-induced apoptosis in absence of Bax; evidence of involvement of apoptotic proteins upstream of mitochondria / A. Molouki, K. Yusoff // *Virology*. – 2012. – 9. – P. 179. doi: 10.1186/1743-422X-9-179.
182. Mu, C.F. Targeted drug delivery for tumor therapy inside the bone marrow / C.F. Mu, J. Shen, J. Liang et al. // *Biomaterials*. – 2018. – 155. – P. 191-202. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.029.
183. Mullen, J.T. Viral oncolysis / J.T. Mullen, K.K. Tanabe // *Oncologist*. – 2002. – 7 (2). – P. 106-119. doi: 10.1634/theoncologist.7-2-106.
184. Munir, M. Genomic and biological characterization of a velogenic Newcastle disease virus isolated from a healthy backyard poultry flock in 2010 / M. Munir, M. Abbas, M.T. Khan et al. // *Virology*. – 2012. – 9. – P. 46. doi: 10.1186/1743-422X-9-46.
185. Nayerossadat, N. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery / N. Nayerossadat, T. Maedeh, P.A. Ali // *Adv Biomed Res*. – 2012. – 1. – P. 27. doi: 10.4103/2277-9175.98152.
186. Nelson, C.B. An outbreak of conjunctivitis due to Newcastle disease virus (NDV) occurring in poultry workers / C.B. Nelson, B.S. Pomeroy, K. Schroll et al. // *Am J Public Health*. – 1952. – 42 (6). – P. 672-678.
187. NIH, U. S. National Library of Medicine [Электронный ресурс] / NIH. – 2018. – Режим доступа: <https://www.clinicaltrials.gov/>
188. NIH, U. S. Topics in integrative, alternative, and complementary therapies (PDQ®)–health professional version [Электронный ресурс] / NIH. – 2018а. – Режим доступа: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/cam/hp/cam-topics-pdq#link/85_toc
189. OIE. World Organisation for Animal Health. WAHID [Электронный ресурс] / OIE. – 2014. – Режим доступа: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.
190. OIE. World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Электронный ресурс] / OIE. – 2012. – Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
191. OIE. Infection with Newcastle disease virus. Chapter 10.9. [Электронный ресурс] / OIE - Terrestrial Animal Health Code - 26/07/2017. – 2017. – Режим доступа: http://www.rr-africa.oie.int/docspdf/en/Codes/en_csat-vol2.pdf.
192. Oncolytics, Biotech Inc. [Электронный ресурс] / Oncolytics Biotech Inc. – 2018. – Режим доступа: <https://www.oncolyticsbiotech.com/>

193. Orvedahl, A. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein / A. Orvedahl, D. Alexander, Z. Talloczy et al. // *Cell Host Microbe*. – 2007. – 1 (1). – P. 23 – 35. doi: 10.1016/j.chom.2006.12.001.
194. Ostertag, D. Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector / D. Ostertag, K.K. Amundson, F. Lopez Espinoza et al. // *Neuro Oncol*. – 2012. – 14 (2). – P. 145-159. doi: 10.1093/neuonc/nor199.
195. Ottaviani, G. Laser therapy inhibits tumor growth in mice by promoting immune surveillance and vessel normalization / G. Ottaviani, V. Martinelli, K. Rupel et al. // *E Bio Medicine*. – 2016. – 11. – P. 165-172. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.07.028.
196. Paldurai, A. Effects of naturally occurring six- and twelve-nucleotide inserts on Newcastle disease virus replication and pathogenesis / A. Paldurai, S. Xiao, S.H. Kim et al. // *PLoS One*. – 2014. – 9 (8). – P. e103951. doi: 10.1371/journal.pone.0103951.
197. Park, S.H. Phase 1b trial of biweekly intravenous Pexa-Vec (JX-594), an oncolytic and immunotherapeutic vaccinia virus in colorectal cancer / S.H. Park, C.J. Breitbach, J. Lee et al. // *Mol Ther*. – 2015. – 23 (9). – P. 1532-1540. doi: 10.1038/mt.2015.109.
198. Park, M.S. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction / M.S. Park, A. Garcia-Sastre, J.F. Cros et al. // *J Virol*. – 2003. – 77 (17). – P. 9522-9532. doi: 10.1128/JVI.77.17.9522-9532.2003.
199. Parsa, N. Environmental factors inducing human cancers / N. Parsa // *Iran J Public Health*. – 2012. – 41 (11). – P. 1 - 9.
200. Pchelkina, I.P. Characteristics of pigeon paramyxovirus serotype-q isolates (PPMV-1) from the Russian Federation from 2001 to 2009 / I.P. Pchelkina, T.B. Manin, S.N. Kolosov et al. // *Avian Dis*. – 2013. – 57. – P. 2 – 7. doi: 10.1637/10246-051112-Reg.1.
201. Pecora, A.L. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers / A.L. Pecora, N. Rizvi, G.I. Cohen et al. // *J Clin Oncol*. – 2002. – 20 (9). – P. 2251-2266. doi: 10.1200/JCO.2002.08.042.
202. Pestka, D. Occurrence, characteristics and control of pigeon paramyxovirus type 1 in pigeons / D. Pestka, T. Stenzel, A. Koncicki // *Pol J Vet Sci*. – 2014. – 17 (2). – P. 379-384. doi: 10.2478/pjvs-2014-0056.
203. Pol, J. Trial watch - oncolytic viruses and cancer therapy / J. Pol, A. Buqué, F. Aranda et al. // *Oncoimmunology*. – 2015. – 5 (2). – P. e1117740. doi: 10.1080/2162402X.2015.1117740.
204. Proskuryakov, S.Y. Mechanisms of tumor cell necrosis / S.Y. Proskuryakov, V.L. Gabai // *Curr Pharm Des*. – 2010. – 16 (1). – P. 56 - 68. doi: 10.2174/138161210789941793.

205. Pühler, F. Generation of a recombinant oncolytic Newcastle disease virus and expression of a full IgG antibody from two transgenes / F. Pühler, J. Willuda, J. Puhmann et al. // *Gene Ther.* – 2008. – 15 (5). – P. 371-383. doi: 10.1038/sj.gt.3303095.
206. Puhmann, J. Rac1 is required for oncolytic NDV replication in human cancer cells and establishes a link between tumorigenesis and sensitivity to oncolytic virus / J. Puhmann, F. Pühler, D. Mumberg et al. // *Oncogene.* – 2010. – 29 (15). – P. 2205 - 2216. doi: 10.1038/onc.2009.507.
207. Qiu, X. Newcastle disease virus V protein targets phosphorylated STAT1 to block IFN-I signaling / X. Qiu, Q. Fu, C. Meng et al. // *PLoS One.* – 2016. – 11 (2). – P. e0148560. doi: 10.1371/journal.pone.0148560.
208. Qu, C.Y. Value of bevacizumab in treatment of colorectal cancer: A meta-analysis / C.Y. Qu, Y. Zheng, M. Zhou et al. // *World J Gastroenterol.* – 2015. – 21 (16). – P. 5072-5080. doi: 10.3748/wjg.v21.i16.5072.
209. Rajmani, R.S. HN protein of Newcastle disease virus induces apoptosis through SAPK/JNK pathway / R.S. Rajmani, R.K. Gandham, S.K. Gupta et al. // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2015. – 177 (4). – Vol. 940-956. doi: 10.1007/s12010-015-1788-7.
210. Rajmani, R.S. HN protein of Newcastle disease virus sensitizes HeLa cells to TNF- α -induced apoptosis by downregulating NF- κ B expression / R.S. Rajmani, S.K. Gupta, P.K. Singh et al. // *Arch Virol.* – 2016. – 161 (9). – P. 2395-2405. doi: 10.1007/s00705-016-2923-7.
211. Ramey, A.M. Genetic diversity and mutation of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) in wild birds and evidence for intercontinental spread / A.M. Ramey, A.B. Reeves, H. Ogawa et al. // *Arch Virol.* – 2013. – 158. – P. 2495 – 2503.
212. Raper, S.E. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer / S.E. Raper, N. Chirmule, F.S. Lee et al. // *Mol Genet Metab.* – 2003. – 80 (1-2). – P. 148-158. doi:10.1016/j.ymgme.2003.08.016.
213. Ravindra, P.V. Induction of apoptosis in Vero cells by Newcastle disease virus requires viral replication, de-novo protein synthesis and caspase activation / P.V. Ravindra, A.K. Tiwari, B. Ratta et al. // *Virus Res.* – 2008. – 133 (2). – P. 285-290. doi: 10.1016/j.virusres.2008.01.010.
214. Ravindra, P. Newcastle disease virus-induced cytopathic effect in infected cells is caused by apoptosis / P. Ravindra, A.K. Tiwari, B. Ratta et al. // *Virus Res.* – 2009a. – 141 (1). – P. 13–20. doi: 10.1016/j.virusres.2008.12.008.
215. Ravindra, P.V. Newcastle disease virus as an oncolytic agent / P.V. Ravindra, A.K. Tiwari, B. Sharma et al. // *Indian J Med Res.* – 2009. – 130 (5). – P. 507-513.

216. Reichard, K.W. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells / K.W. Reichard, R.M. Lorence, C.J. Cascino et al. // *J Surg Res.* – 1992. – 52 (5). – P. 448-453.
217. Roberts, Z.J. Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL / Z.J. Roberts, M. Better, A. Bot et al. // *Leuk Lymphoma.* – 2017. – 23. – P. 1-12. doi: 10.1080/10428194.2017.1387905.
218. Roos, F.C. Oncolytic targeting of renal cell carcinoma via encephalomyocarditis virus / F.C. Roos, A.M. Roberts, I.I. Hwang et al. // *EMBO Mol Med.* – 2010. – 2 (7). – P. 275-288. doi: 10.1002/emmm.201000081.
219. Rosalia, R.A. Use of enhanced interleukin-2 formulations for improved immunotherapy against cancer / R.A. Rosalia, N. Arenas-Ramirez, G. Bouchaud et al. // *Curr Opin Chem Biol.* – 2014. – 23. – P. 39-46. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.09.006.
220. Russo, A.E. Bevacizumab in the treatment of NSCLC: patient selection and perspectives / A.E. Russo, D. Priolo, G. Antonelli et al. // *Lung Cancer (Auckl).* – 2017. – 8. – P. 259-269. doi: 10.2147/LCTT.S110306.
221. Rutkowski, K. Administration of yellow fever vaccine in patients with egg allergy / K. Rutkowski, P.W. Ewan, S.M. Nasser // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2013. – 161 (3). – P. 274 - 278. doi: 10.1159/000346350.
222. Saito, Y. Oncolytic replication-competent adenovirus suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region / Y. Saito, M. Sunamura, F. Motoi et al. // *Cancer Gene Ther.* – 2006. – 13 (3). – P. 242-252. doi: 10.1038/sj.cgt.7700902.
223. Sampson, J.H. Editorial on "heat shock protein peptide complex-96 (HSPPC-96) vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single arm trial" / J.H. Sampson, G. Vlahovic // *Neuro Oncol.* - 2014. – 16 (2). - P. 169-70. doi: 10.1093/neuonc/not311.
224. Saran, U. Cellular and molecular effects of the mTOR inhibitor everolimus / U. Saran, M. Foti, J.F. Dufour // *Clin Sci (Lond).* – 2015. – 129 (10). – P. 895-914. doi: 10.1042/CS20150149.
225. Schirmacher, V. Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity / V. Schirmacher, L. Bai, V. Umansky et al. // *Int J Oncol.* – 2000. – 16 (2). – P. 363-373. doi: 10.3892/ijo.16.2.363.
226. Schirmacher V. Newcastle disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy of cancer / V. Schirmacher, P. Fournier // *Gene Therapy of Cancer.* – 2009. – 542. – P. 565-605. doi: 10.1007/978-1-59745-561-9_30.
227. Schirmacher, V. Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus / V. Schirmacher, C. Haas, R. Bonifer et al. // *Gene Ther.* – 1999. – 6 (1). – P. 63-73.

228. Schuler, K.L. Expansion of an exotic species and concomitant disease outbreaks: pigeon paramyxovirus in free-ranging Eurasian collared doves / K.L. Schuler, D.E. Green, A.E. Justice-Allen et al. // *Ecohealth*. – 2012. – 9 (2). – P. 163-170. doi: 10.1007/s10393-012-0758-6.
229. Semedo, D. Metastatic melanoma therapy, Imlygic, now available in EU [Электронный ресурс] / *Immuno-oncology news*. – 2016. – Режим доступа: https://immuno-oncologynews.com/2016/01/07/metastatic-melanoma-therapy-imlygic-now-available-eu/?utm_source=IO+News&utm_campaign=f957441bf0-RSS_WEEKLY_EMAIL_CAMPAIGN&utm_medium=email&utm_term=0_f04c303b86-f957441bf0-71484089.
230. Shibuya, M. VEGFR and type-V RTK activation and signaling / M. Shibuya // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2013. – 5 (10). – P. a009092. doi: 10.1101/cshperspect.a009092.
231. Shimkin, N.I. Conjunctival haemorrhage due to an infection of Newcastle virus of fowls in man (Laboratory and Contact infection) / N.I. Shimkin // *Br J Ophthalmol*. – 1946. – 30 (5). – P. 260-264.
232. Sinkovics, J.G. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains / J.G. Sinkovics, J.C. Horvath // *J Clin Virol*. – 2000. – 16 (1). – P. 1 – 15. doi: [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(99\)00072-4](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(99)00072-4).
233. Solovieva, A.O. Singlet oxygen production and biological activity of hexanuclear chalcocyanide rhenium cluster complexes $[\{\text{Re}_6\text{Q}_8\}(\text{CN})_6]^{4-}$ (Q = S, Se, Te) / A.O. Solovieva, K. Kirakci, A.A. Ivanov et al. // *Inorg Chem*. – 2017. – 56 (21). – P. 13491-13499. doi: 10.1021/acs.inorgchem.7b02212.
234. Song, D.Z. TRAIL is involved in the tumoricidal activity of mouse natural killer cells stimulated by Newcastle disease virus in vitro / D.Z. Song, Y. Liang, Q. Xiao et al. // *Anat Rec (Hoboken)*. – 2013. – 296 (10). – P. 1552 - 1560. doi: 10.1002/ar.22768.
235. Song, J.M. Advances in novel influenza vaccines: a patent review / J.M. Song // *J Microbiol*. – 2016. – 54 (6). – P. 403 - 412. doi: 10.1007/s12275-016-6176-7.
236. Song, K.Y. Antitumor efficacy of viral therapy using genetically engineered Newcastle disease virus [NDV(F3aa)-GFP] for peritoneally disseminated gastric cancer / K.Y. Song, J. Wong, L. Gonzalez et al. // *J Mol Med (Berl)*. – 2010. – 88 (6). – P. 589-596. doi: 10.1007/s00109-010-0605-6.
237. Spear, B.B. Clinical application of pharmacogenetics / B.B. Spear, M. Heath-Chiozzi, J. Huff et al. // *Trends Mol Med*. – 2001. – 7 (5). – P. 201-204.
238. Sui, H. NDV-D90 suppresses growth of gastric cancer and cancer-related vascularization / H. Sui, K. Wang, R. Xie et al. // *Oncotarget*. – 2017. – 8 (21). – P. 34516-34524. doi: 10.18632/oncotarget.16563.

239. Szeberenyi, J. Newcastle disease virus-induced apoptosis in PC12 pheochromocytoma cells / J. Szeberenyi, Z. Fabian, B. Torocsik et al. // *Am J Ther.* – 2003. – 10 (4). – P. 282–288.
240. Taipale, K. Chronic activation of innate immunity correlates with poor prognosis in cancer patients treated with oncolytic adenovirus / K. Taipale, I. Liikanen, J. Juhila et al. // *Mol Ther.* – 2016. – 24 (1). – P. 175-183. doi: 10.1038/mt.2015.143.
241. Tagliamonte, M. Antigen-specific vaccines for cancer treatment / M. Tagliamonte, A. Petrizzo, M.L. Tornesello et al. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – 10 (11). – P. 3332-3346. doi: 10.4161/21645515.2014.973317.
242. Takeuchi, O. Innate immunity to virus infection / O. Takeuchi, S. Akira // *Immunol Rev.* – 2009. – 227 (1). – P. 75-86. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x.
243. Tayeb, S. Therapeutic potential of oncolytic Newcastle disease virus: a critical review / S. Tayeb, Z. Zakay-Rones, A. Panet // *Oncolytic Virotherapy.* – 2015. – 2015 (4). – P. 49-62. <http://dx.doi.org/10.2147/OV.S78600>.
244. Tedcastle, A. Virotherapy – cancer targeted pharmacology / A. Tedcastle, R. Cawood, Y. Di et al. // *Drug Discov Today.* – 2012. – 17 (5-6). – P. 215-220. doi: 10.1016/j.drudis.2011.12.011.
245. The council of the European communities. Council Directive 92/66/EEC of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease / The council of the European communities // *Official Journal L* 260. – 1992. – P. 0001-0020. <http://data.europa.eu/eli/dir/1992/66/oj>.
246. Tocagen Inc. [Электронный ресурс] / Tocagen. – 2018. - Режим доступа: <http://tocagen.com/>
247. Tocagen Inc. A Phase 1 Ascending Dose Trial of the Safety and Tolerability of Toca 511 in Patients With Recurrent High Grade Glioma. NLM Identifier: NCT01156584. [Электронный ресурс] / *ClinicalTrials.gov.* – 2018a. – Режим доступа: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01156584>.
248. Tocagen Inc. P2/3 Randomized study of Toca 511 & Toca FC versus SOC in subjects undergoing surgery for recurrent GBM/AA (Toca5). NLM Identifier: NCT02414165. [Электронный ресурс] / *ClinicalTrials.gov.* – 2018b. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02414165>.
249. Tolf, C. Prevalence of avian paramyxovirus type 1 in mallards during autumn migration in the western Baltic Sea region / C. Tolf, M. Wille, A. Haidar et al. // *Virol J.* – 2013. – 10. – P. 285. doi: 10.1186/1743-422X-10-285.

250. Toyota, M. Comparison of the peripheral doses from different IMRT techniques for pediatric head and neck radiation therapy / M. Toyota, Y. Saigo, K. Higuchi et al. // *Radiat Prot Dosimetry*. – 2017. – 176 (3). – P. 322-330. doi: 10.1093/rpd/ncx013.
251. Tsai, F.C. Safety and efficacy of endoscopic spray cryotherapy for esophageal cancer / F.C. Tsai, S. Ghorbani, B.D. Greenwald et al. // *Dis Esophagus*. – 2017. – 30 (11). – P. 1-7. doi: 10.1093/dote/dox087.
252. Tsimberidou, A.M. Targeted therapy in cancer / A.M. Tsimberidou // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 2015. – 76 (6). – P. 1113-1132. doi: 10.1007/s00280-015-2861-1.
253. Ungerechts, G. Moving oncolytic viruses into the clinic: clinical-grade production, purification, and characterization of diverse oncolytic viruses / G. Ungerechts, S., Bossow B. Leuchs et al. // *Mol Ther Methods Clin Dev*. – 2016. – 3. – P. 16018. doi: 10.1038/mtm.2016.18.
254. Vandenabeele, P. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion / P. Vandenabeele, L. Galluzzi, T.V. Berghe et al. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2010. – 11 (10). – P. 700-714. doi:10.1038/nrm2970.
255. Vigil, A. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector for cancer therapy / A. Vigil, O. Martinez, M.A. Chua et al. // *Mol Ther*. – 2008. – 16 (11). – P. 1883-1890. doi: 10.1038/mt.2008.181.
256. Vigil, A. Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus / A. Vigil, M.S. Park, O. Martinez et al. // *Cancer Res*. – 2007. – 67 (17). – P. 8285-8292. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1025.
257. Viralytics. Developers of oncolytic immunotherapies [Электронный ресурс] / Viralytics. – 2018. – Режим доступа: <http://www.viralytics.com/>
258. Visnuvinayagam, S. Assessment of the pathogenicity of cell-culture-adapted Newcastle disease virus strain Komarov / S. Visnuvinayagam, K. Thangavel, N. Lalitha et al. // *Braz J Microbiol*. – 2015. – 46 (3). – P. 861 - 865. doi: 10.1590/S1517-838246320140051.
259. Wagner, S. Combined treatment of pediatric high-grade glioma with the oncolytic viral strain MTH-68/H and oral valproic acid / S. Wagner, C.M. Csatory, G. Gosztonyi et al. // *APMIS*. – 2006. – 114 (10). – P. 731 - 743. doi: 10.1111/j.1600-0463.2006.apm_516.x.
260. Walter, R.J. Newcastle disease virus LaSota strain kills human pancreatic cancer cells in vitro with high selectivity / R.J. Walter, B.M. Attar, A. Rafiq et al. // *JOP J Pancreas*. – 2012. – 13 (1). – P. 45-53.
261. Washburn, B. TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by Newcastle disease virus / B. Washburn, M.A. Weigand, A. Grosse-Wilde et al. // *J Immunol*. – 2003. – 170 (4). – P. 1814-1821. doi: 10.4049/jimmunol.170.4.1814.

262. WCRF. Comparing more & less developed countries [Электронный ресурс] / World cancer research fund international. – 2018. – Режим доступа: <https://www.wcrf.org/int/cancer-trends/comparing-more-less-developed-countries>.
263. Weber, J.S. Toxicities of immunotherapy for the practitioner / J.S. Weber, J.C. Yang, M.B. Atkins et al. // *J Clin Oncol*. – 2015. – 33 (18). – P. 2092-2099. doi: 10.1200/JCO.2014.60.0379.
264. Weinberg, R.A. The biology of cancer. 2nd ed. / R.A. Weinberg. - New York: Garland Science, 2007. – 749 p.
265. Wen, Q. Fusion cytokine IL-2-GMCSF enhances anticancer immune responses through promoting cell-cell interactions / Q. Wen, W. Xiong, J. He et al. // *J Transl Med*. – 2016. – 14. – P. 41. doi: 10.1186/s12967-016-0799-7.
266. Wennier, S.T. Bugs and drugs: oncolytic virotherapy in combination with chemotherapy / S.T. Wennier, J. Liu, G. McFadden // *Curr Pharm Biotechnol*. – 2012. – 13 (9). – P. 1817-1833.
267. Wheelock, E.F. Observations on the repeated administration of viruses to a patient with acute leukemia. A preliminary report / E.F. Wheelock, J.H. Dingle // *N Engl J Med*. – 1964. – 271 (13). – P. 645-651.
268. WHO. Cancer today IARC by GLOBOCAN [Электронный ресурс] / WHO. – 2018. – Режим доступа: <http://gco.iarc.fr/today/home>.
269. WHO, Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [Электронный ресурс] / WHO. – 2011. - Режим доступа: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf;jsessionid=E809B BF6E7FAD9118D7247FB101FF77E?sequence=1.
270. WHO, IARC. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012 [Электронный ресурс] / WHO. – 2018a. – Режим доступа: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
271. WHO. Vaccines [Электронный ресурс] / WHO. – 2018b. – Режим доступа: <http://www.who.int/topics/vaccines/en/>.
272. Wong, H.H. Oncolytic viruses for cancer therapy: overcoming the obstacles / H.H. Wong, N.R. Lemoine, Y. Wang // *Viruses*. – 2010. – 2. – P. 78 - 106. doi: 10.3390/v2010078.
273. Wu, W. Molecular and antigenic characteristics of Newcastle disease virus isolates from domestic ducks in China / W. Wu, H. Liu, T. Zhang et al. // *Infect Genet Evol*. – 2015. – 32. – P. 34 – 43. doi: 10.1016/j.meegid.2015.02.016.
274. Wu, Y. Apoptin enhances the oncolytic properties of Newcastle disease virus / Y. Wu, X. Zhang, X. Wang et al. // *Intervirology*. – 2012. – 55 (4). – P. 276-286. doi: 10.1159/000328325.
275. Yang, Z. Eaten alive: a history of macroautophagy / Z. Yang, D.J. Klionsky // *Nat Cell Biol*. – 2010. – 12 (9). – P. 814-822. doi: 10.1038/ncb0910-814.

276. Young, L.S. Viruses and apoptosis / L.S. Young, C.W. Dawson, A.G. Eliopoulos // *Br Med Bull.* – 1997. – 53 (3). – P. 509-521.
277. Yu, W. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China / W. Yu, H. Fang // *Curr Cancer Drug Targets.* – 2007. – 7 (2). – P. 141-148. doi:10.2174/156800907780058817.
278. Yu, B. A serological survey of human adenovirus serotype 2 and 5 circulating pediatric populations in Changchun, China, 2011 / B. Yu, Z. Wang, J. Dong et al. // *Viol J.* – 2012. – 9. – P. 287. doi: 10.1186/1743-422X-9-287.
279. Yu, B. Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenovirus type 5 in healthy adults in China / B. Yu, Y. Zhou, H. Wu et al. // *J Med Virol.* – 2012a. – 84 (9). – P. 1408-1414. doi: 10.1002/jmv.23325
280. Yusoff, K. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities / K. Yusoff, W.S. Tan // *Avian Pathol.* – 2001. – 30 (5). – P. 439-455.
281. Zamarin, D. Enhancement of oncolytic properties of recombinant Newcastle disease virus through antagonism of cellular innate immune responses / D. Zamarin, L. Martínez-Sobrido, K. Kelly et al. // *Mol Ther.* – 2009. – 17 (4). – P. 697-706. doi: 10.1038/mt.2008.286.
282. Zamarin, D. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions / D. Zamarin, P. Palese // *Future Microbiol.* – 2012. – 7 (3). – P. 347-367. doi: 10.2217/fmb.12.4.
283. Zhang, W. Bevacizumab with angiostatin-armed oHSV increases antiangiogenesis and decreases bevacizumab-induced invasion in U87 glioma / W. Zhang, G. Fulci, J.S. Buhrman et al. // *Mol Ther.* – 2012. – 20 (1). – P. 37-45. doi: 10.1038/mt.2011.187.
284. Zhao, X. Strategic combinations: the future of oncolytic virotherapy with reovirus / X. Zhao, C. Chester, N. Rajasekaran et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2016. – 15 (5). – P. 767-773. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0695.
285. Zhen, S. Inhibition of long non-coding RNA UCA1 by CRISPR/Cas9 attenuated malignant phenotypes of bladder cancer / S. Zhen, L. Hua, Y.H. Liu et al. // *Oncotarget.* – 2017. – 8 (6). – P. 9634-9646. doi: 10.18632/oncotarget.14176.
286. Zhen, S. Targeted delivery of CRISPR/Cas9 to prostate cancer by modified gRNA using a flexible aptamer-cationic liposome / S. Zhen, Y. Takahashi, S. Narita et al. // *Oncotarget.* – 2017a. – 8 (6). – P. 9375-9387. doi: 10.18632/oncotarget.14072.
287. Zhivotovsky, B. Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease / B. Zhivotovsky, S. Orrenius // *Exp Cell Res.* – 2010. – 316 (8). – P. 374 – 1383. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.037.
288. Ziegler, U. Morphological features of cell death / U. Ziegler, P. Groscurth // *News Physiol Sci.* – 2004. – 19. – P. 124-128.

289. Zorn, U. Induction of cytokines and cytotoxicity against tumor cells by Newcastle disease virus / U. Zorn, I. Dallmann, J. Grosse et al. // *Cancer Biother.* – 1994. – 9 (3). – P. 225-235.
290. Zygiert, Z. Hodgkin's disease: remissions after measles / Z. Zygiert // *Lancet.* – 1971. – 1 (7699). – P. 593.