

Сосновцева А.О.¹, Каршиева С.Ш.², Смирнова Г.Б.², Борисова Ю.А.², Лебединская О.В.³, Шубина И.Ж.²,
Трещалина Е.М.², Чумаков П.М.⁴, Чехонин В.П.^{1,5}

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРЕВИВАЕМОЙ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА К ОНКОЛИТИЧЕСКОМУ ВИРУСУ КОКСАКИ А7

¹ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия;

² ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, г. Пермь, Россия

⁴ ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, 119991, г. Москва, Россия;

⁵ ФГБУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского» Минздрава России, 119034, г. Москва, Россия;

Онколитическая виротерапия – перспективный подход в таргетной терапии злокачественных новообразований. В данной работе исследован терапевтический потенциал непатогенного вируса Коксаки А7 с нейротропными свойствами на модели нейробластомы (НБ) человека.

Цель исследования: изучение чувствительности *in vitro/in vivo* НБ человека (из линии клеток JMR-32) к действию вируса Коксаки А7 (CVA7). Задачи – определение цитолитической активности CVA7 на верифицированных цитоморфологически клетках НБ в тесте *in vitro* и оценка динамики роста подкожных (п/к) ксенографтов НБ у мышей-самцов Balb/c nude под действием CVA7 при многократном внутривенном введении. **Материал и методы.** Исследования выполнены с CVA7, нарабатанным в клетках линии-продуцента С-33А. Культуру клеток и штамм перевиваемой НБ (JMR-32) получали из коллекции РОНЦ. Цитоморфологическую верификацию НБ и определение цитолитической активности CVA7 выполняли с помощью стандартных культуральных методов и критериев ТЦД₅₀, IC₅₀. Опыты *in vivo* выполнены на иммунодефицитных мышьях-самцах Balb/c nude разведения и содержания РОНЦ с развившимся к 6-му дню до Vcr = 79–82 мм³ п/к ксенографтами НБ. Лечение CVA7 в разовой дозе 1•10⁸ клеток/мышь проводили внутривенно трехкратно (через 72 ч) с оценкой эффективности по стандартному критерию T/C ≤ 42% и контролем скорости роста опухоли (V/V₀) в динамике. Статистическую значимость различий проводили в компьютерной программе Exel для Windows 2007 с использованием t-теста при p < 0,05.

Результаты. Цитолитический эффект CVA7 на клетки НБ регистрируют на уровне исходной линии-продуцента С-33А ТЦД₅₀ = 0,99•10⁻⁴ БОЕ/кл, а IC₅₀ = 1,11•10⁻⁴ БОЕ/кл, а уровень репродукции вируса в клетках НБ через 48 и 72 ч на 2 и 1,5 порядка выше, чем в клетках линии-продуцента. Ингибирующее действие CVA7 на рост больших п/к ксенографтов НБ реализуется после введения в/в первой дозы на минимальном уровне T/C = 67% (критерий ≤ 42%) на фоне уменьшения скорости роста опухоли в 1,5 раза и отмены ранней гибели мышей, на 22-й день, тогда как в группе нелеченного контроля – на 15-й (n = 8).

Заключение. Полученные данные позволяют считать НБ человека (JMR-32) *in vitro/in vivo* слабочувствительной к онколитическому действию CVA7. Для получения значимого результата *in vivo* следует начинать лечение при двукратно меньших опухолях и увеличенной первой дозой онколитического препарата.

Ключевые слова: онколитический вирус; вирус Коксаки А7; нейробластома человека; чувствительность *in vitro/in vivo*.

Для цитирования: Сосновцева А.О., Каршиева С.Ш., Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Лебединская О.В., Шубина И.Ж., Трещалина Е.М., Чумаков П.М., Чехонин В.П. Чувствительность перевиваемой нейробластомы человека к онколитическому вирусу Коксаки А7. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22(2): 158–163. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-2-158-163>

Для корреспонденции: Сосновцева Анастасия Олеговна, аспирант кафедры медицинских нанобиотехнологий, E-mail: aososnovtceva@gmail.com.

Sosnovtceva A.O.¹, Karshieva S.Sh.², Smirnova G.B.², Borisova Yu.A.², Lebedinskaya O.V.³, Shubina I.Zh.², Treshalina H.M.², Chumakov P.M.⁴, Chekhonin V.P.^{1,3}

SENSITIVITY OF THE TRANSPLANTED HUMAN NEUROBLASTOMA TO ONCOLYTIC COXSACKIE A7 VIRUS

¹ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation;

² N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, 119034, Russian Federation;

³ V.P. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, 115478, Russian Federation;

⁴ Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russian Federation;

⁵ E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm, 614990, Russian Federation

Oncolytic viral therapy is a promising approach to targeted therapy of malignant tumors. In this article we consider the therapeutic potential of a non-pathogenic Coxsackie A7 virus (CA7V) with neurotropic properties on a model of human neuroblastoma.

Purpose to study *in vitro/in vivo* sensitivity of human neuroblastoma HNB (from cell line JMR-32) to Coxsackie virus A7 (CA7V). Objectives: evaluation of cytolytic activity *in vitro* on NB cells verified by cytomorphology and assessment of dynamics of the growth of subcutaneous neuroblastoma xenografts in Balb/c nude male mice exposed to CA7V multiple *i.v.* injections.

Material and methods. CA7V was produced in the cells of line-producer C-33A. Cell culture and the strain of transplanted NB (JMR-32) were obtained from the Collection of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center. Cytomorphologic verification of neuroblastoma and CA7V cytolytic activity were executed with the use of standard cultural methods, TCID₅₀ and IC₅₀ criteria. Experiments «in vivo» were performed on immunodeficient Balb/c nude male mice bred and reared in the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center. The experiments were made at day 6 when neuroblastoma subcutaneous xenografts developed to the $V_{mean} = 79-82 \text{ mm}^3$ by day 6. The treatment with CA7V at the i.v. single dose of 1×10^8 cells per mouse was performed 3 times with 72-hours intervals; evaluation of the efficacy was made according to standard criterion $T/C \leq 42\%$; and control of the tumor growth rate (V/V_0) in the dynamics. Statistical assessment was made with the software Excel for Windows 2007 with the use of T-test under $p \leq 0.05$.

Results. Cytolytic effect of CA7V on neuroblastoma cells was registered similar to basic parameters of the original line-producer C-33A: TCID₅₀ = 0.99×10^{-4} pfu/cell, and IC₅₀ = 1.11×10^{-4} pfu/cell; 48 and 72 hours after virus reproduction in NB cells the rate was 2.0 and 1.5-fold higher than in the line-producer cells. CA7V inhibiting effect on the growth of large subcutaneous neuroblastoma xenografts is registered after the first i.v. injection at the minimal level of $T/C = 67\%$ (criterion $\leq 42\%$) with the 1.5-fold decrease of the tumor growth rate and cancellation of early mice death by day 22 vs day 15 in the control group of untreated mice ($n = 8$).

Conclusion. The obtained results allow to consider human neuroblastoma (JMR-32) to possess the low sensitivity to oncolytic effect of in vitro/in vivo. In order to obtain significant effect in vivo the treatment should be started in mice with 2-fold smaller tumors and a higher initial dose of the oncolytic agent.

Key words: oncolytic virus; Coxsackie A7 virus; human neuroblastoma; sensitivity in vitro/in vivo.

For citation: Sosnovtceva A.O., Karshieva S.Sh., Smirnova G.B., Borisova Yu.A., Lebedinskaya O.V., Shubina I.Zh., Treshalina H.M., Chumakov P.M., Chekhonin V.P. Sensitivity of the transplanted human neuroblastoma to oncolytic Coxsackie A7 virus. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. (Russian Journal of Oncology)*. 2017; 22(3): 158–163. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-3-158-163>

For correspondence: Anastasiia O. Sosnovtceva, MD, PhD-student of the Department of Medical Nanobiotechnology of the Medical Biological Faculty of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation. E-mail: aososnovtceva@gmail.com.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was supported by the RSF (grant №14-14-00882).

Received 23 November 2016
 Accepted 22 December 2016

Нейробластома (НБ) – одна из наиболее распространенных солидных опухолей у детей. Лечение больших НБ группы высокого риска имеет ограниченную эффективность и неблагоприятный прогноз [1]. Это обуславливает необходимость разработки новых стратегий лечения НБ. В последние годы идет активная разработка различных подходов таргетной терапии опухолевых заболеваний. Один из таких подходов – онколитическая виротерапия (ОВТ), которая использует различные репликативно-компетентные вирусы, способные напрямую лизировать опухолевые клетки и в некоторых случаях активировать иммунную систему. В качестве перспективных кандидатов для ОВТ НБ изучают как ДНК-, так и РНК-содержащие вирусы [2–5]. Использование РНК-содержащих вирусов имеет несколько терапевтических преимуществ: отсутствие генотоксичности, так как эти вирусы реплицируются в цитоплазме; кроме этого, в ходе инфицирования клеток они сразу индуцируют стойкие цитолитические изменения, также они не несут онкогены, которые могут привести к онкогенезу и быть легко генетически изменены с помощью методов обратной генетики [6].

В качестве перспективных кандидатов для противоопухолевой терапии рассматривают мелкие РНК-содержащие одноцепочечные энтеровирусы (*Enterovirus*) с высоким онколитическим потенциалом, например вакцинные и рекомбинантные штаммы полиовирусов, *Coxsackie A21* и *B3*, *ECHO 1* и *7* [2, 7–11]. Вирус Коксаки А7 (*Human coxsackievirus A7 strain Parker*, GenBank AY421765, *CVA7*) (вид *Enterovirus A*, семейство *Picornoviridae*) *in vivo* проявляет миотропные и нейротропные свойства, а при инфицировании человека вызывает полиомие-

литоподобные симптомы [12, 13]. В СССР в 1960–1970-х годах выделен непатогенный штамм *CVA7*, на его основе получена одна из живых энтеровирусных вакцин (ЖЭВ-8), которая в дальнейшем была апробирована для профилактики респираторных и энтеровирусных заболеваний более чем у полу-миллиона человек. Также для нее была исследована возможность лизиса злокачественных клеток у ряда онкологических больных с исчерпанными возможностями лечения [7, 14, 15]. Проведенные исследования позволяют считать *CVA7* из ЖЭВ-8 одним из перспективных энтеровирусов для изучения на модели НБ человека в качестве нового безопасного авирулентного онколитического таргетного средства с естественной нейротропностью. Соответственно сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования – изучение чувствительности *in vitro/in vivo* НБ (из линии клеток JMR-32) к действию вируса Коксаки А7 (*CVA7*).

Задачи исследования – определение цитолитической активности *CVA7* на верифицированных цитоморфологически клетках НБ в тесте *in vitro* и оценка динамики роста подкожных (п/к) ксенографтов НБ у мышей-самцов Balb/c nude под действием *CVA7* при многократном внутривенном введении (в/в).

Материал и методы

Тестируемый агент. Вирус *CVA7* нарабатывали в клетках HPV-негативной карциномы шейки матки человека С-33А (АТСС, НТВ-31). После микроскопической констатации 100% гибели клетки вместе с вирусосодержащей средой лизировали трехкратным замораживанием–оттаиванием и осветляли центрифугированием, полученный супернатант исполь-

зовали в тесте *in vitro*. Для экспериментов *in vivo* в течение 2 ч проводили концентрирование вирусного препарата на ультрацентрифуге при 45 000 об/мин (ротатор угловой, TLA-100.3, BeckmanCoulter, USA), супернатант удаляли, осадок растворяли ресуспендированием в стерильном физиологическом растворе («ПанЭко», Россия). Вирусный титр определяли стандартным методом бляшек и выражали в БОЕ/мл (бляшкообразующие единицы). Полученный стоковый раствор вируса хранили при -20°C . В день введения животным стоковые растворы размораживали и готовили аликвоты для внутривенного (в/в) введения ($1 \cdot 10^8$ БОЕ/200 мкл физиологического раствора) с помощью индивидуальных стерильных пластиковых шприцов. Введение CVA7 после трансплантации опухоли выполняли трехкратно с интервалом 72 ч (6-е, 9-е и 12-е сутки) в разовой дозе $1 \cdot 10^8$ БОЕ/200 мкл физраствора, курсовая доза $3 \cdot 10^8$ БОЕ/мышь.

Опухолевая модель. Линия клеток эстроген- и андроген-независимой перевиваемой НБ (JMR-32) и опухолевый штамм для п/к трансплантации получены из коллекции опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина [16]. Для культурального теста клетки НБ размораживали при 37°C в водяной бане 3–5 мин, осаждали центрифугированием при 1000 об/мин 5–7 мин и переносили во флаконы площадью 25 см^2 с ростовыми средами RPMI-1640 и DMEM, содержащими 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), а также в смесь этих сред в соотношении 1:1 с целью выбора оптимальных условий для наращивания клеточной массы. Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Заменяли среду на свежую на следующие сутки после размораживания и далее в процессе роста клеток через каждые 3 сут. Пересев культуры осуществляли при достижении клетками плотного монослоя один раз в 3 дня. Получение донорского опухолевого материала НБ выполняли на мышцах-самцах Balb/c nude на мышшь ($n = 2$) разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина при трехкратном пассировании: 0 пассаж $5 \cdot 10^6$ клеток, 1-й и 2-й пассажи – по 50 мг взвеси опухолевой ткани на мышшь.

Оценка результатов *in vitro*. Для анализа вирусной репликации монослой клеток в 24-луночных планшетах инфицировали вирусом в дозе 0,001 БОЕ/кл и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Несвязавшийся вирус удаляли, клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером и содержали в ростовой среде с 2% ЭТС. Через 0; 24; 48 и 72 ч клетки в ростовой среде лизировали с помощью 3 циклов замораживания–оттаивания. Жидкость с лизированными клетками очищали низкоскоростным центрифугированием и использовали для определения стандартного показателя 50% тканевой цитотоксической дозы (ТЦД₅₀/мл) на линии-продуценте С-33А методом Рида–Менча. Уровень вирусной репродукции в клетках определяли каждые 24 ч в течение 72 ч. Определение чувствительности клеток к CVA7 *in vitro* проводили в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^7$ до $1 \cdot 10^1$ БОЕ/мл с помощью Cell Titer 96 A Queous One Solution Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS-тест, Promega), как описано ранее [17]. Результаты представляли в процентах от неинфицированного контроля. Поскольку тестируемый вирусный материал рассматривали в качестве потенциально противоопухолевого средства, чувствительность клеток к CVA7 определяли по концентрации, способ-

ной уменьшить пролиферацию клеток на 50% (50% ингибирующая концентрация, IC₅₀), используемой для противоопухолевых агентов. Показатель рассчитывали методом регрессионного анализа (данные MTS-теста и графика «доза–ответ»).

Оценка результатов *in vivo*. Лечение в группе ОБТ вирусом CVA7 проводили трехкратно, на 6-е, 9-е и 12-е сутки после трансплантации опухоли; в группе КРО мыши получали физраствор в те же сроки. Исходный объем опухоли составил $V_0 = 79 \pm 46\text{ мм}^3$. Начало введения (48 ч после трансплантации опухоли) связано с завершением аваскулярной стадии ангиогенеза и обеспечением биодоступности агента к клеткам, в том числе при внутривенной терапии. В обеих группах измеряли опухолевые узлы трехкратно до проведения инъекции и на 3-и сутки после окончания трехкратного курса ОБТ. Для измерений использовали штангенциркуль (Mitutoyo, Япония), соединенный USB-портом со статистической программой Excel. С помощью нее рассчитывали индивидуальные и средние объемы (средняя арифметическая V_0, V_{1-3}), стандартное отклонение (standard deviation, s. d.) и *Ttest*. По полученным данным определяли стандартный показатель эффективности Т/С% (treatment/control) как соотношение средних объемов опухолей в сравнении с группой контроля роста опухоли (КРО), критерий $\text{T/C} \leq 42\%$ [18]. Кроме того, рассчитывали скорость роста опухолей в каждой группе как соотношение V_{1-3}/V_0 и *Ttest* в сравниваемых группах. Сформированная таким образом база данных была первичным документом эксперимента. В таблицах приведено стандартное отклонение, при построении графиков – разброс с учетом доверительного интервала средней арифметической величины.

Результаты исследований *in vitro/in vivo* статистически обрабатывали с оценкой достоверности различий при $p \leq 0,05$.

Завершение эксперимента на животных. После окончания опыта выживших на 23-е сутки опыта мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза. Трупы павших и умерщвленных мышей подвергали аутопсии и кремировали в специализированном подразделении с учетом международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, изложенных в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», ЕЭС, Страсбург (1985) [19, 20].

Результаты

Цитологическая верификация нейробластомы человека НБ (JMR-32). При цитоморфологическом исследовании показано, что клетки НБ человека (JMR-32) 9-го пассажа имеют большие размеры, округлую или неправильную форму. Контуры клеток неровные – от тела клетки распространяются многочисленные псевдоподии и мелкие выросты. Ядра округлые, овальные или бобовидной формы с вдавлениями. В некоторых клетках наблюдают нарушение целостности ядерных мембран. У отдельных клеток ядра фрагментированы. Содержимое ядер неоднородное. В них на фоне эухроматина выявляют плотные глыбки хроматина разной величины, неправильной формы и округлые образования, похожие на ядрышки. Глыбки хроматина иногда выходят за

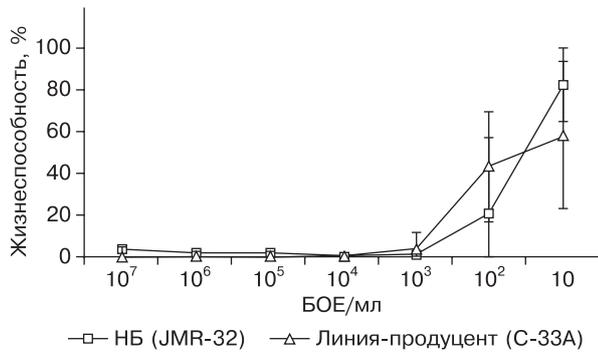


Рис. 2. Определение жизнеспособности клеток нейробластомы человека (JMR-32) и линии-продуцента (С-33А) в MTS-тесте через 72 ч после заражения CVA7.

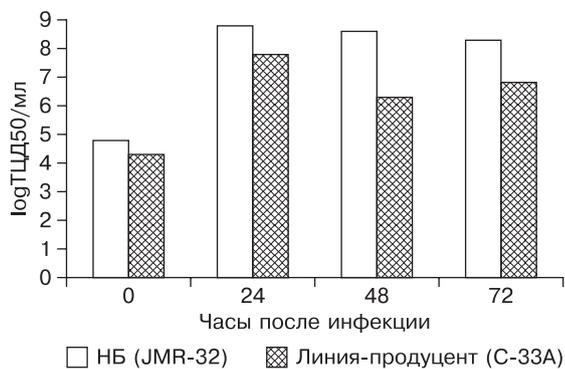


Рис. 3. Динамика вирусной репродукции CVA7 в клетках нейробластомы человека и линии-продуцента (метод Рида и Менча).

пределы ядра. Заметно разделение цитоплазмы на участки, прилегающие к ядру (эндоплазма), и периферические зоны (эктоплазма). Эндоплазма более базофильная, эктоплазма светлая, вуалевидная. Характер и эндо- и эктоплазмы неоднородный – вакуолизированный (рис. 1, см. 4-ю полосу вклейки).

Тестирование in vitro. Результаты MTS-теста представлены на рис. 2. Видно, что для CVA7 $TCID_{50} = 0,99 \cdot 10^{-4}$ БОЕ/кл, а $IC_{50} = 1,11 \cdot 10^{-4}$ БОЕ/кл. Это свидетельствует о высокой и сравнимой чувствительности к вирусу клеток НБ и исходной линии-продуцента С-33А в тестах *in vitro*. Способность CVA7 реплицироваться в чувствительных клетках представлена на рис. 3. Как видно, CVA7 способен размножаться в клетках НБ (JMR-32), так же как и в клетках линии-продуцента, в течение 72 ч, причем уровень репродукции вируса в клетках НБ через 48–72 ч на 2 и 1,5 порядка соответственно выше, чем в клетках линии-продуцента. Таким образом, в экспериментах *in vitro* вирус CVA7 показал активность в отношении клеток НБ (JMR-32), превышающую уровень активности в клетках, используемых для его наработки.

Тестирование in vivo. Показано, что п/к ксенографты НБ без лечения (группа КРО) растут чрезвычайно быстро: от 6 до 15 сут после трансплантации опухолевые узлы увеличились от $V_0 = 79 \pm 46$ до $V_{13} = 1629 \pm 1224$ мм³, $V_{13}/V_0 = 20,6$. Это свидетельствует

Таблица 1

Динамика роста подкожных ксенографтов нейробластомы человека у мышей-самцов Balb/c nude без лечения (группа КРО)

№ мыши, показатели	Средний объем опухоли после трансплантации*, мм ³			
	6-е, 9-е и 12-е сутки			15-е сутки
	V_0	V_{t1}	V_{t2}	V_{t3}
	6	9	12	15
1	19	27	36	405
2	113	478	1024	3740
3	79	414	1122	2470
4	84	280	630	1496
5	64	330	745	2755
6	72	247	499	499
7	190	711	1346	842
8	27	193	378	822
9	90	526	1914	Пала от опухоли
10	48	120	265	Пала от иммунодефицита
11	78	429	998	Пала от иммунодефицита
$V_{ср.}$	79	341	814	1629
Стандартное отклонение	46	196	539	1224
T/C, %	100	100	100	100
V_t/V_0	1,0	4,3	10,3	20,6

Примечание: * – измерение опухолевых узлов проводили до начала инъекций физраствора (V_0), после каждой инъекции (V_{t1} и V_{t2}) и затем соответственно 3 сут после окончания введения ОВТ (V_{t3}); период наблюдения 6–22 сут, гибель мышей от опухоли зарегистрирована с 15-х суток после трансплантации.

об агрессивном характере модели. На 9–15-е сутки после трансплантации скорость роста соответствовала кинетике штамма: $V_{t1-3} = 4,3–20,6$ соответственно. Гибель мышей от опухоли зарегистрирована, начиная с 15-х сут опыта (табл. 1).

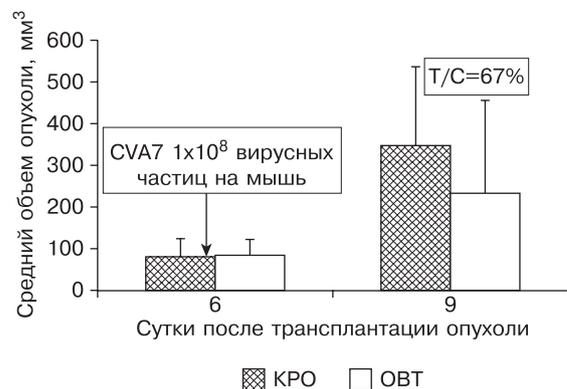


Рис. 4. Ингибирование роста подкожных ксенографтов нейробластомы человека после первой внутривенной инъекции 10^8 вирусных частиц/мышь CVA7. Здесь и на рис. 5: КРО – группа без лечения; ОВТ – группа, получающая вирус Коксаки А7.

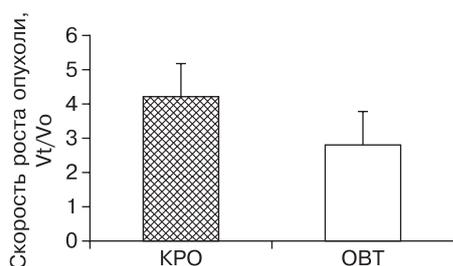


Рис. 5. Скорость роста подкожных ксенографтов нейробластомы человека у мышей Balb/c nude контрольной и опытной групп через 9 сут после имплантации (через 3 дня после начала терапии).

В группе OBT, получавшей CVA7 п/к ксенографты НБ росли от 6-х до 22-х суток опыта с такой же скоростью и увеличились от $V_0 = 82 \pm 39$ до $V_{15} = 6692 \pm 2126$ мм³, $V_{15}/V_0 = 81,2$. Оценка эффективности ингибирования роста опухоли в группе OBT в динамике показала, что слабый недостоверный эффект на уровне $T/C = 67\%$ ($Ttest = 0,28$) наступал только после 1-й инъекции (рис. 4), а после 2-й и 3-й инъекций эффект практически отсутствовал, $T/C = 94-107$ ($Ttest = 0,83-0,98$).

Анализ скорости роста в группе OBT показал, что после первой инъекции на 9-е сутки скорость роста ксенографтов (V_{t1}/V_0) была в 1,5 раза ниже, чем в кон-

троле: 2,8 и 4,3 соответственно (рис. 5). Начало гибели мышей от опухоли зарегистрировано на 5 дней позже – 22-е сутки после трансплантации (табл. 2).

Заключение

Проведенные исследования показали, что вирус CVA7 проявляет определенный цитолитический эффект по отношению к клеткам НБ (JMR-32), $ТЦД_{50} = 0,99 \cdot 10^{-4}$ БОЕ/кл, $IC_{50} = 1,11 \cdot 10^{-4}$ БОЕ/кл. При этом уровень репродукции вируса в опухолевых клетках через 48 и 72 ч на 2 и 1,5 порядка выше, чем в клетках линии-продуцента.

Ингибирующее действие CVA7 на рост развившихся п/к ксенографтов НБ реализуется после введения в/в первой дозы на минимальном уровне $T/C = 67\%$ (критерий $\leq 42\%$) на фоне уменьшения скорости роста опухоли в 1,5 раза и отмены ранней гибели мышей – на 22-е и 15-е сутки в группе нелегального контроля соответственно ($n = 8$).

Полученные данные позволяют считать НБ (JMR-32) *in vitro/in vivo* слабочувствительной к онколитическому действию CVA7. Для получения значимого результата *in vivo* следует начинать лечение при двукратно меньших опухолях и увеличенной первой дозой онколитического препарата.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 14-14-00882).

ЛИТЕРАТУРА

- Weinstein J.L., Katzenstein H.M., Cohn S.L. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist*. 2003; 8(3): 278–92.
- Toyoda H., Yin J, Mueller S, Wimmer E., Cello J. Oncolytic treatment and cure of neuroblastoma by a novel attenuated poliovirus in a novel poliovirus-susceptible animal model. *Cancer Res*. 2007; 67(6): 2857–64.
- Parikh N.S., Currier M.A., Mahller Y.Y., Adams L.C., Di Pasquale B., Collins M.H. Oncolytic herpes simplex virus mutants are more efficacious than wild-type adenovirus Type 5 for the treatment of high-risk neuroblastomas in preclinical models. *Pediatr Cancer*. 2005; 44(5): 469–78.
- Pesonen S., Helin H., Nokisalmi P., Escutenaire S., Ribacka C., Sarkioja M., Cerullo V. Oncolytic adenovirus treatment of a patient with refractory neuroblastoma. *Acta Oncol*. 2010; 49(1): 120–2.
- Garcia-Castro J., Alemany R., Cascalló M., Martínez-Quintanilla J., Arriero Mdel M., Lassaletta A. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther*. 2010; 17(7): 476–83.
- Miyamoto S., Inoue H., Nakamura T., Yamada M., Sakamoto C., Urata Y., Okazaki T. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2012; 72(10): 2609–21.
- Чумаков П.М., Морозова В.В., Бабкин И.В., Байков И.К., Нетесов С.В., Тикунова Н.В. Онколитические энтеровирусы. *Молекулярная биология*. 2012; 46(5): 712–25.
- Skelding K.A., Barry R.D., Shafren D.R. Systemic targeting of metastatic human breast tumor xenografts by Coxsackievirus A21. *Breast Cancer Res. Treat*. 2009; 113(1): 21–30.
- Haley E.S., Au G.G., Carlton B.R., Barry R.D., Shafren D.R. Regional administration of oncolytic Echovirus 1 as a novel therapy for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *J. Mol. Med*. 2009; 87(4): 385–99.
- Shafren D.R., Sylvester D., Johansson E.S., Campbell I.G., Barry

Таблица 2

Динамика роста подкожных ксенографтов нейробластомы человека у мышей-самцов Balb/c nude в процессе и после трехкратного курса внутривенных инъекций CVA7 в разовой дозе 10^8 вирусных частиц/мышь (группа OBT)

№ мыши, показатели	Средний объем опухоли, мм ³			
	V_0	V_{t1}	V_{t2}	V_{t3}
1	110	341	1073	2093
2	144	259	374	1218
3	63	84	379	572
4	27	100	301	1250
5	93	732	2096	3220
6	36	59	554	1217
7	94	90	734	2156
8	89	177	609	2218
V_{cp}	82	230	765	1743
Стандартное отклонение	39	225	592	834
T/C, %	104	67	94	107
Ttest	–	0,28	0,86	0,83
V_t/V_0	1,0	2,8	9,3	21,3

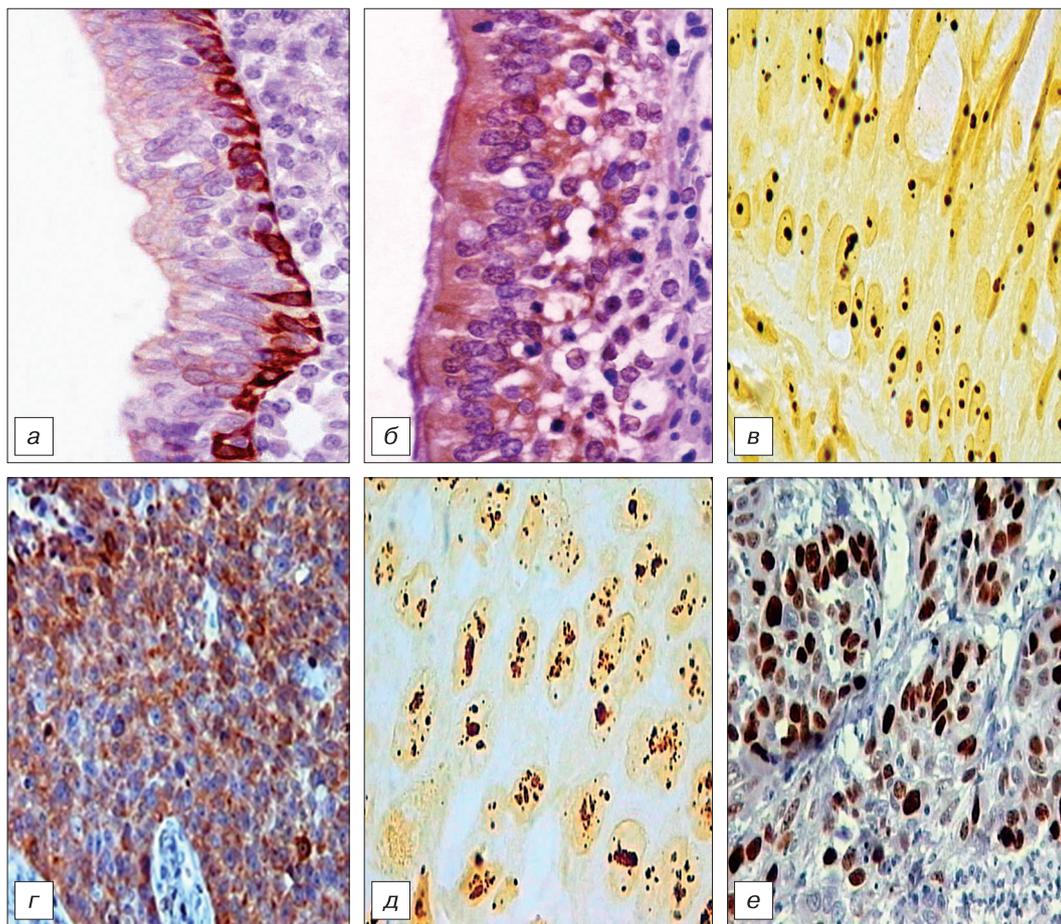
Примечание. Введения выполняли на 6-е, 9-е и 12-е сутки после трансплантации опухоли. Измерение опухолевых узлов проводили до проведения каждой инъекции OBT и на 3-и сутки после окончания курса лечения; гибель мышей от опухоли зарегистрирована на 22-е сутки после трансплантации.

- R.D. Oncolysis of human ovarian cancers by echovirus type 1. *Int. J. Cancer*. 2005; 115(2): 320–8.
11. Doniņa S., Strēle I., Proboka G., Auziņš J., Alberts P., Jonsson B. Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study. *Melanoma Res*. 2015; 25(5): 421.
 12. Seitsonen J.J., Shakeel S., Susi P., Pandurangan A.P., Sinkovits R.S., Hyvönen H. Structural analysis of coxsackievirus A7 reveals conformational changes associated with uncoating. *J. Virol*. 2012; 86(13): 7207–15.
 13. Mahy B.W. J. *The Dictionary of Virology*. Atlanta: Academic Press; 2009.
 14. Нетёсов С.В., Кочнева Г.В., Локтев В.Б., Святченко В.А., Сергеев А.Н., Терновой В.А. и др. Онколитические вирусы: достижения и проблемы. *Эпидемиология и санитария*. 2011;(3): 10–7.
 15. Сейбиль В.Б., Малышкина Л.П. Проблема ликвидации полиомиелита как инфекции требует иного решения. В кн.: *Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Медицинская вирусология*. М.; 2014; 28(1): 30–6.
 16. Трещалина, Е.М. *Коллекция штаммов опухолей человека / Под ред. М.И. Давыдова*. М.: Практическая медицина; 2009: 88–90.
 17. Сосновцева А.О., Липатова А.В., Гриненко Н.Ф., Баклаушев В.П., Чумаков П.М., Чехонин В.П. Чувствительность клеток глиомы С6, несущих полиовирусный рецептор человека к онколитическим полиовирусам. *Бюл. exper. биол*. 2016; 161(6): 780–4.
 18. Трещалина Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.: Гриф и К.; 2012; Ч. 1.: 642–57.
 19. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург. 1985. *Ланималогия*. 1993; (1): 29.
 20. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ. 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. *Качественная клиническая практика*. 2002; (9): 24–8.
 5. Garcia-Castro J., Alemany R., Cascallo M., Martinez-Quintanilla J., Arriero Mdel M., Lassaletta A. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther*. 2010; 17(7): 476–83.
 6. Miyamoto S., Inoue H., Nakamura T., Yamada M., Sakamoto C., Urata Y., Okazaki T. Coxsackievirus B3 is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2012; 72(10): 2609–21.
 7. Chumakov P.M., Morozova V.V., Babkin I.V., Baykov I.K., Netesov S.V., Tikunova N.V. Oncolytic enteroviruses. *Molekulyarnaya biologiya*. 2012; 46(5): 712–25. (in Russian)
 8. Skelding K.A., Barry R.D., Shafren D.R. Systemic targeting of metastatic human breast tumor xenografts by Coxsackievirus A21. *Breast Cancer Res. Treat*. 2009; 113(1): 21–30.
 9. Haley E.S., Au G.G., Carlton B.R., Barry R.D., Shafren D.R. Regional administration of oncolytic Echovirus 1 as a novel therapy for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *J. Mol. Med*. 2009; 87(4): 385–99.
 10. Shafren D.R., Sylvester D., Johansson E.S., Campbell I.G., Barry R.D. Oncolysis of human ovarian cancers by echovirus type 1. *Int. J. Cancer*. 2005; 115(2): 320–8.
 11. Doniņa S., Strēle I., Proboka G., Auziņš J., Alberts P., Jonsson B. Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study. *Melanoma Res*. 2015; 25(5): 421.
 12. Seitsonen J.J., Shakeel S., Susi P., Pandurangan A.P., Sinkovits R.S., Hyvonen H. Structural analysis of coxsackievirus A7 reveals conformational changes associated with uncoating. *J. Virol*. 2012; 86(13): 7207–15.
 13. Mahy B.W. J. *The Dictionary of Virology*. Atlanta: Academic Press; 2009.
 14. Netesov S.V., Kochneva G.V., Loktev V.B., Svyatchenko V.A., Sergeev A.N., Ternovoy V.A. et al. Oncolytic viruses: progress and problems. *Epidemiologiya i sanitariya*. 2011; (3): 10–7. (in Russian)
 15. Seybil' V.B., Malyskhina L.P. The problem of eradication of poliomyelitis as infections requires different solutions. In: *[Trudy Instituta poliomiellita i virusnykh entsefalitov imeni M.P. Chumakova RAMN. Meditsinskaya virusologiya]*. Moscow; 2014; 28(1): 30–6. (in Russian)
 16. Treshchalina E.M. *The Collection of Human Tumor Strains. / Ed. M.I. Davydov*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2009. (in Russian)
 17. Sosnovtseva A.O., Lipatova A.V., Grinenko N.F., Baklaushev V.P., Chumakov P.M., Chekhonin V.P. The sensitivity of the C6 glioma cells carrying the human poliovirus receptor to oncolytic poliovirus. *Bul. Exper. Biol*. 2016; 161(6): 780–4. (in Russian)
 18. Treshchalina E.M. Guidelines for preclinical study of antitumor activity of drugs. In: *Guidelines for Preclinical Studies of Drugs*. Moscow: Grif i K; 2012; Pt. 1: 642–57. (in Russian)
 19. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, the EC, Strasbourg. 1985. *Lanimalogiya*. 1993; (1): 29. (in Russian)
 20. Bol'shakov O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*. 2002; (9): 24–8. (in Russian)

REFERENCES

Поступила 23.11.16
Принята к печати 22.12.16

К ст. А.У. Панасьяна и соавт.



Маркёры апоптоза и пролиферации в норме и при НМКРЛ: экспрессия bcl-2 (а), vax (б) и Ag-YOP-белков (в) в патологически не изменённой слизистой оболочке бронха; экспрессия bcl-2 (г), Ag-YOP-белков (д) и Ki-67 (е) при умеренно-дифференцированном плоскоклеточном раке (а, б, г, е – иммуногистохимический метод, увеличение в 400 раз; в, д – окраска азотнокислым серебром, увеличение в 1000 раз).

К ст. А.О. Сосновцевой и соавт.

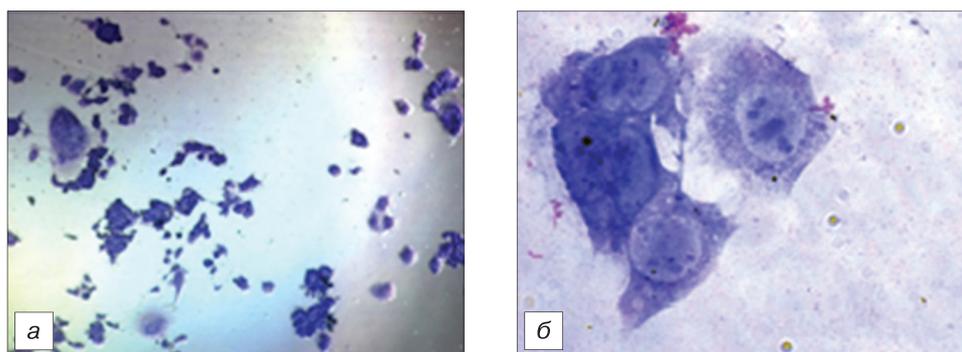


Рис. 1. Цитоморфологическая картина клеток 9-го пассажа нейробластомы человека (JMR-32). Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.: справа – 50, слева – 400.