

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК**  
**СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ**  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**  
**ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ**  
**МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи



**Разработка подходов терапии глиом с помощью**  
**онколитического вируса VV-GMCSF-Lact**

Васильева Наталья Сергеевна

1.5.3 Молекулярная биология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
**к.б.н. Кулигина Елена Владимировна**

Новосибирск-2024

## Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	6
ВВЕДЕНИЕ .....	8
Глава 1: Глиома: Особенности опухоли и виротерапия как перспективный терапевтический подход (Обзор литературы) .....	13
1.1. Гетерогенность глиомы и идентификаторы молекулярных подтипов.....	13
1.1.1. Глиома.....	13
1.1.2. Внутриопухолевая гетерогенность глиом .....	15
1.1.3. Молекулярные подтипы глиом.....	17
1.2. Терапия глиом.....	19
1.2.1. Хирургическая резекция глиом .....	19
1.2.2. Радиотерапия глиом.....	19
1.2.3. Химиотерапия глиом .....	20
1.2.4. Иммуноterapia глиом.....	21
1.2.4.1. Ингибиторы контрольных точек иммунитета .....	22
1.2.4.2. Противоопухолевые вакцины .....	23
1.2.4.3. Онколитические вирусы в терапии глиом .....	25
1.2.4.3.1. Вирус простого герпеса I типа .....	26
1.2.4.3.2. Аденовирусы.....	27
1.2.4.3.3. Парвовирусы .....	28
1.2.4.3.4. Вирус болезни Ньюкасла .....	29
1.2.4.3.5. Вирус осповакцины .....	29
1.2.4.3.6. Виротерапия глиом в России.....	33
1.2.4.3.7. Комбинация виротерапии и других терапевтических подходов .....	34
1.3. Механизмы резистентности глиом .....	36
1.3.1. Резистентность глиом к радиотерапии .....	37
1.3.2. Резистентность глиом к химиотерапии .....	38
1.3.3. Резистентность глиом к иммунотерапии.....	43
1.3.3.1. Резистентность глиом к виротерапии .....	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	49
ГЛАВА 2: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	50
2.1. Материалы и оборудование.....	50
2.1.1. Реактивы.....	50
2.1.2. Оборудование и материалы .....	52
2.1.3. Олигонуклеотиды для генспецифичной ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени.....	53
2.1.4. Вирус.....	53

2.1.5. Животные .....	54
2.1.6. Буферы и растворы.....	54
2.1.7. Культуры клеток эукариот.....	55
2.2. Методы .....	55
2.2.1. Получение культур клеток глиом из образцов опухолей пациентов .....	55
2.2.2. Культивирование клеток иммортализованных линий глиом человека и глиомы С6 крысы .....	56
2.2.3. Культивирование клеток глиом человека в адгерентных условиях и в условиях формирования нейросфер .....	56
2.3.4. Проточная цитометрия.....	57
2.3.5. Вестерн-блот .....	57
2.3.5.1. Подготовка лизатов клеток глиом .....	57
2.3.5.2. Электрофорез .....	58
2.3.5.3. Электроперенос .....	58
2.3.5.4. Детекция целевых белков .....	58
2.3.5.5. Ко-иммунопреципитация.....	59
2.3.6. Оценка уровня экспрессии генов <i>SOX-2</i> и <i>MYC</i> в клетках культур глиом человека ..	59
2.3.6.1. Выделение РНК .....	59
2.3.6.2. Обработка ДНКазой .....	59
2.3.6.3. ОТ-ПЦР в режиме реального времени .....	60
2.3.7. Оценка цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом человека и крысы.....	60
2.3.8. Оценка цитотоксической активности химиопрепаратов в отношении клеток глиом человека .....	61
2.3.9. Оценка комбинированного действия темозоломида и VV-GMCSF-Lact .....	61
2.3.10. Оценка биораспределения VV-GMCSF-Lact в организме мышей линии SCID.....	62
2.3.10.1. Выделение ДНК.....	62
2.3.10.2. ПЦР в режиме реального времени.....	63
2.3.11. Исследование противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиом человека <i>in vivo</i> .....	63
2.3.12. Противоопухолевая эффективность комбинации VV-GMCSF-Lact и ТМЗ в отношении глиобластомы U87 MG .....	64
2.3.13. Ортотопическая трансплантация глиомы С6 крысам линии Wistar.....	65
2.3.14. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы С6 <i>in vivo</i> .....	66
2.3.15. Оценка апоптотических процессов в клетках глиом под действием .....	68
VV-GMCSF-Lact .....	68
2.3.16. Статистика.....	68

ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....	69
3.1. Получение и характеристика культур клеток глиом, полученных из образцов опухолей пациентов, как модели для оценки цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact .....	69
3.1.1. Получение культур клеток глиом из образцов опухолей различной степени злокачественности .....	69
3.1.2. Характеристика клеток immortalized линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов .....	75
3.2. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении клеток immortalized линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов .....	80
3.3. Оценка противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы человека в модели ксенографтов .....	82
3.3.1. Противоопухолевая и антиметастатическая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении опухолей U87 MG и U343 MG глиобластомы человека .....	82
3.3.2. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении ксенографтов глиобластомы человека, полученной из образца опухоли пациента .....	85
3.4. Биораспределение VV-GMCSF-Lact при внутривенном введении лабораторным животным .....	87
3.5. Оценка эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении синграфтов глиомы C6 крысы .....	90
3.5.1. Оценка цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиомы C6 крысы .....	90
3.5.2. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении ортотопически трансплантированной глиомы C6 .....	92
3.6. Анализ совместного действия VV-GMCSF-Lact и химиопрепаратов в отношении глиом человека .....	98
3.6.1. Цитотоксическая активность химиопрепаратов в отношении клеток глиом человека .....	99
3.6.2. Совместное действие VV-GMCSF-Lact и темозоломида на клетки глиом человека <i>in vitro</i> .....	100
3.6.3. Оценка комбинации VV-GMCSF-Lact и темозоломида <i>in vivo</i> .....	105
3.7. Исследование механизмов, обуславливающих чувствительность клеток глиом человека к действию VV-GMCSF-Lact .....	111
3.7.1. Оценка уровня белков, опосредующих проникновение VV-GMCSF-Lact в клетки глиом человека .....	112
3.7.2. Анализ апоптотических процессов в клетках глиобластомы человека под действием VV-GMCSF-Lact .....	119
3.7.3. Оценка уровня белков, участвующих в VV-GMCSF-Lact-опосредованной гибели клеток глиом человека .....	121
3.7.4. Анализ уровня белков, участвующих в активации митохондриального пути апоптоза в клетках глиом человека под действием VV-GMCSF-Lact .....	124



3.7.5. Предлагаемая модель молекулярного механизма, определяющего чувствительность клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact.....	133
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	138
ВЫВОДЫ .....	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	142
Приложение А.....	180
Приложение Б .....	186
Приложение В.....	190

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

Akt – серин/треонин киназа;

BBTB – blood-brain-tumor barrier, гематоопухолевый барьер;

Bcl-2 – белок В-клеточной лимфомы 2;

CD133 – кластер дифференцировки 133, промиелин-1;

CD15 – кластер дифференцировки 15, 3-фукозил-N-ацетиллактозамин, Lewis X;

CD171 – кластер дифференцировки 171, молекула адгезии нейтральных клеток L1;

CD44 – кластер дифференцировки 44, гликопротеин клеточной поверхности, участвует в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции;

c-Myc – протоонкоген, белок миелоцитоматоза;

CTLA-4 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4;

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста;

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;

GFAP – глиальный кислый фибриллярный белок;

HPRT – гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза;

IDH – изоцитрат дегидрогеназа;

IL-1 $\beta$ , 2, 6, 12 – интерлейкины-1 $\beta$ , 2, 6, 12;

Ki-67 – антиген Kiel 67;

MDM2 – убиквитин-протеинлигаза E3, murine double minute 2;

MGMT – O<sup>6</sup>-алкилгуанин ДНК-алкилтрансфераза;

MMR – система репарации “мисматчей”;

mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих;

PAK1 – p21-активированная киназа 1;

PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1;

PDGFRA – рецептор тромбоцитарного фактора роста A;

PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1;

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа;

PTEN – гомолог фосфатазы и тензина;

RIPK1 – взаимодействующая с рецептором серин/треонин-протеинкиназа 1;

RIPK3 – взаимодействующая с рецептором серин/треонин-протеинкиназа 3;

Smac – вторичный митохондриальный активатор апоптоза;

SOX-2 – SRY (определяющая пол область Y-хромосомы)-бокс-2;

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов;

XIAP – X-связанный ингибитор апоптоза;

БОЕ – бляшкообразующая единица;

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения;

ГМ-КСФ – гранулоцитарно- макрофагальный колониестимулирующий фактор;

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

МРТ – магнитно-резонансная томография;

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

СОК – стволовые опухолевые клетки;

ТМЗ – темозоломид;

ТРО – торможение роста опухоли;

ЦНС – центральная нервная система.

## ВВЕДЕНИЕ

Сложность лечения опухолей головного мозга обусловлена их расположением в жизненно важных областях мозга, гетерогенностью, а также быстрым прогрессированием и устойчивостью к стандартным терапевтическим средствам. Глиомы 4 степени злокачественности, в частности глиобластомы, на сегодняшний день являются одними из наиболее агрессивных опухолей головного мозга, при которых средняя выживаемость пациентов составляет не более 15 месяцев [1]. Лечение злокачественных глиом является достаточно сложным и дорогостоящим. Стандартная терапия включает максимальную хирургическую резекцию опухоли с последующей радио- и/или химиотерапией [2]. Однако применяемая мультимодальная терапия не позволяет в достаточной степени повысить качество жизни пациентов с данным диагнозом [3,4]. Кроме того, с момента включения в стандартную схему лечения в 2005 году темозоломида, применение которого позволило повысить среднюю выживаемость пациентов на 2,5 месяца [5], значительных успехов в разработке новых подходов, увеличивающих выживаемость пациентов и/или улучшающих качество их жизни, достигнуто не было. Таким образом, поиск и разработка более эффективных методов терапии злокачественных глиом является актуальной задачей современных биомедицинских исследований.

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных и активно развивающихся терапевтических подходов является виротерапия, или терапия с помощью онколитических вирусов. Виротерапия представляет собой иммунотерапевтический подход, основанный на вирус-опосредованной гибели опухолевых клеток и индукции иммунного ответа организма [6]. По данным сайта [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) в настоящее время различные онколитические вирусы, такие как герпесвирусы, аденовирусы, вирусы осповакцины и другие, проходят клинические испытания в качестве потенциальных агентов для лечения опухолей головного мозга, в том числе глиобластомы. Однако на данный момент лишь один препарат – Делитакт (Delytact), созданный на основе вируса простого герпеса типа 1 G47Δ, получил одобрение для терапии глиобластомы в Японии [7].

Отсутствие значительных успехов в терапии глиобластомы объясняется, в частности, формированием резистентности к противоопухолевым агентам. Как и другие опухоли, глиобластома характеризуется множеством обуславливающих лекарственную устойчивость особенностей, среди которых можно выделить внутриопухолевую гетерогенность, накопление мутаций, уклонение от иммунного ответа, эффект Варбурга, гиперактивацию и подавление различных клеточных сигнальных путей и другие [8]. Один из наиболее известных механизмов резистентности глиобластомы заключается в уклонении

от цитотоксического действия алкилирующих агентов, таких как темозоломид (ТМЗ), за счёт гипометилирования промотора гена Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT), которая является ферментом репарации ДНК [9]. Изучены и другие пути, обуславливающие неэффективность терапии и практически неизбежный рецидив глиобластомы [10,11]. При этом вопрос о формировании резистентности опухолевых клеток к вирусной терапии остаётся открытым [12,13].

### **Цель и задачи исследования**

**Целью** данной работы являлась оценка терапевтического потенциала рекомбинантного онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы человека и разработка подходов терапии глиальных опухолей с помощью VV-GMCSF-

В ходе исследования необходимо **было решить следующие задачи:**

1. Получить панель культур клеток глиом человека из образцов опухолей различной степени злокачественности и охарактеризовать клетки полученных культур и клетки immortalized линий глиом человека по молекулярным маркерам стволовых опухолевых клеток;
2. Оценить цитотоксическое действие VV-GMCSF-Lact в отношении клеток immortalized линий и полученных от пациентов культур глиом человека *in vitro*;
3. Оценить противоопухолевую и антиметастатическую активность VV-GMCSF-Lact на мышинной модели ксенотрансплантатов глиом человека;
4. Исследовать биораспределение VV-GMCSF-Lact при внутривенном введении здоровым животным и мышам с ортотопически трансплантированной глиобластомой U87
5. Оценить противоопухолевую эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении синграфтов глиомы C6 крысы;
6. Провести анализ совместного действия VV-GMCSF-Lact и темозоломида на мышинной модели ксенотрансплантатов глиом человека;
7. Исследовать механизмы, способные обуславливать устойчивость клеток глиомы к действию VV-GMCSF-Lact.

### **Научная новизна и практическая значимость**

В результате оценки терапевтического потенциала рекомбинантного онколитического вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы человека показано, что данный вирус является перспективным для дальнейших доклинических и

клинических испытаний. Впервые показана способность VV-GMCSF-Lact проникать через гематоэнцефалический барьер и установлено, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью *in vitro* и противоопухолевой эффективностью *in vivo* в отношении глиом человека и животных.

Проведена оценка комбинированного действия VV-GMCSF-Lact и химиотерапевтических агентов, используемых при терапии злокачественных опухолей головного мозга. Впервые предложен перспективный подход терапии глиом – совместное применение VV-GMCSF-Lact и темозоломида, а также схема использования препаратов для дальнейших доклинических и клинических исследований.

Предложен возможный механизм устойчивости клеток глиом человека к действию VV-GMCSF-Lact. Впервые показано, что в клетках глиом, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact снижается уровень белка p53 и повышается уровень белков-ингибиторов апоптоза: активированной киназы Akt1 и белка XIAP.

Согласно полученным результатам, онколитический вирус VV-GMCSF-Lact является перспективным кандидатным препаратом для терапии глиом человека.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Онколитический вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток иммортализованных линий и культур глиом человека, полученных из образцов опухолей пациентов. Чувствительность исследуемых клеток к вирусу не зависит от степени злокачественности первичной опухоли и уровня маркеров стволовых опухолевых клеток;
2. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact обладает высокой противоопухолевой и антиметастатической активностью в отношении глиом человека в мышинной модели подкожных ксенографтов;
3. VV-GMCSF-Lact проникает как через интактный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), так и через ГЭБ животных с ортотопически трансплантированными опухолями. При внутривенном введении VV-GMCSF-Lact распределяется по всем органам и тканям, включая мозг, и селективно реплицируется в опухолевой ткани;
4. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact при внутриопухолевом введении крысам с ортотопически трансплантированной глиомой C6 оказывает антипролиферативное действие на опухоль и препятствует формированию метастазов. При внутривенном введении VV-GMCSF-Lact ингибирует рост глиомы C6;
5. Применение комбинации онколитического вируса VV-GMCSF-Lact и темозоломида является перспективным подходом для терапии глиом. При этом введение

темозоломида в терапевтическую схему должно происходить не ранее чем через 8-9 дней после применения VV-GMCSF-Lact;

6. Предложена модель, описывающая механизмы, участвующие в формировании чувствительности клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact. Модель основана на взаимодействии клеточных белков – участников процессов апоптоза и некроптоза, и вирусных белков, способных влиять на элементы сигнальных путей гибели клеток. Согласно предложенной модели, киназа Akt1 и белок XIAP могут являться потенциальными мишенями таргетной терапии в комбинации с VV-GMCSF-Lact.

### **Публикации и апробация результатов**

По результатам диссертации опубликовано 4 работы в рецензируемых научных журналах. Основные результаты работы были представлены на: международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2019), форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Новосибирск, Россия, 2020), FEBS Virtual Congress (онлайн участие, 2021), Всероссийской научной-практической конференции с международным участием «Цивьяновские чтения» (Новосибирск, Россия, 2021), Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, Россия, 2022).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 192 страницах, включает 45 рисунков, 9 таблиц и 3 приложения. Список литературы содержит 373 источника.

### **Личный вклад автора**

Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором. Работы по получению персонализированных культур клеток глиом выполнены совместно с к.б.н., н.с. лаборатории биотехнологии Нуштаевой А.А. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). Работы по культивированию и анализу клеток глиом выполнены совместно с м.н.с. лаборатории биотехнологии Агеенко А.Б. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). Работы по оценке противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении иммунокомпетентной модели глиомы С6 крысы выполнены совместно с к.м.н., с.н.с. лаборатории клеточных технологий Юсубалиевой Г.М. (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, г. Москва) и м.н.с. лаборатории биотехнологии Агеенко А.Б. (ИХБФМ СО РАН, г.

Новосибирск). МРТ-сканирование крыс линии Wistar выполнены заведующим отделением общей рентгенологии, рентгеновской компьютерной и магнитно-резонансной томографии Губским И.Л. (ФЦМН ФМБА России, г. Москва). Анализ МРТ-изображений крыс линии Wistar выполнен к.б.н., с.н.с. лаборатории генетики лабораторных животных Ромащенко А.В. (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Иммуногистохимический анализ опухолей С6 крысы выполнен в ФНКЦ ФМБА России (г. Москва) под руководством заведующего патологоанатомическим отделением д.м.н. Забозлаева Ф.Г. (ФЦМН ФМБА России, г. Москва). Работы по ортотопической трансплантации клеток глиобластомы U87 MG мышам линии SCID выполнены к.б.н., заведующим ЦКП "SPF-виварий" Завьяловым Е.Л. (ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Гистологический анализ опухолей U87 MG после терапии мышей SCID с помощью VV-GMCSF-Lact и темозоломида выполнен к.м.н., с.н.с. лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Сеньковой А.В. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).



## Глава 1: Глиома: Особенности опухоли и виротерапия как перспективный терапевтический подход (Обзор литературы)

### 1.1. Гетерогенность глиомы и идентификаторы молекулярных подтипов

#### 1.1.1. Глиома

Диффузные глиомы характеризуются инвазивным характером роста, диссеминацией опухолевых клеток в окружающие ткани мозга и развитием терапевтической резистентности [14]. Развитию глиом могут способствовать различные факторы окружающей среды, такие как длительное радиационное облучение высокими дозами, производственный контакт с нефтепродуктами и винилхлоридами. Кроме того, провоцирующими факторами могут служить вирусные инфекции, травмы головного мозга и нарушения эндокринных и метаболических процессов [15]. На молекулярном уровне причинами развития глиом могут стать нарушения сигнальных путей, активируемых тирозин-киназными рецепторами, и процессов регуляции клеточного цикла и программ клеточной гибели [16].

По статистике злокачественные глиомы составляют 80% всех опухолей центральной нервной системы [15]. По данным сайта Globocan за 2020 год в Российской Федерации 2,8% смертей происходит от опухолей головного мозга и ЦНС [17], среди которых 47,7% случаев приходится на глиобластому – наиболее агрессивную опухоль глиального происхождения.

Согласно классификации опухолей ЦНС, опубликованной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2016 году [18] в группу диффузных астроцитарных и олигодендроглиальных опухолей входили различного типа астроцитомы и олигодендроглиомы (3 степень злокачественности), диффузная срединная глиома (4 степень злокачественности) и глиобластома (4 степень злокачественности). При этом на основании альтераций ключевых диагностических генов присутствовала дополнительная каталогизация неоплазм, входящих в группу астроцитарных и олигодендроглиальных опухолей, по наличию коделеций 1p/19q и мутаций в генах *IDH* (изоцитрат дегидрогеназа). Опубликованное ВОЗ в 2021 пятое издание классификации опухолей ЦНС содержит значительные изменения в классификации глиом. К опухолям ЦНС 4 степени злокачественности согласно новому изданию относят астроцитомы с мутациями в *IDH*, глиобластомы с *IDH* дикого типа и *H3 G34*-мутантные диффузные полушарные глиомы [14]. Таким образом, в новой классификации наряду с определением гистологических и иммуногистохимических характеристик опухоли большое внимание уделяется

молекулярной диагностике. Поскольку все образцы опухолей, используемые в данной работе, были получены до 2021 года, была применена классификация опухолей ЦНС издания 2016 года.

До недавнего времени в зависимости от происхождения выделяли первичные и вторичные глиобластомы. Данное разделение впервые ввел Ганс Иоахим Шерер, немецкий врач и нейроморфолог [19]. Первичные глиобластомы развиваются *de novo* при отсутствии признаков менее злокачественных предраковых изменений, вторичные глиобластомы прогрессируют из диффузных астроцитов 2-3 степени злокачественности либо из анапластических астроцитов. Позднее появились данные о генетических различиях этих субтипов [20]. К гистопатологическим особенностям глиобластомы относят микроваскулярную пролиферацию, наличие некроза и палисадных структур. Кроме того, для глиобластом характерна гетерогенность на клеточном уровне с пролиферацией фибриллярных, гемистацитарных (гемистоциты представляют собой глиальные клетки, характеризующиеся объемной эозинофильной цитоплазмой и периферически расположенным, часто уплощенным ядром [21]) и рассеянных гигантских клеток (многоядерные гигантские клетки с обильной эозинофильной цитоплазмой [22]) [23]), а также инфильтративный характер роста, что делает полную хирургическую резекцию практически невозможной.

Как было отмечено выше, с 2021 года классификация опухолей ЦНС подверглась серьезным изменениям. Согласно новой классификации опухолей центральной нервной системы ВОЗ 2021 большую значимость при характеристике опухоли приобрели молекулярные маркеры, что позволяет детально интерпретировать диагноз, более эффективно выбирать терапию и определять прогноз для пациентов [14]. Постановка диагноза проводится исходя из результатов многоуровневого интегрированного анализа, отражающего как гистологические, так и молекулярные особенности каждой конкретной опухоли (Рисунок 1).

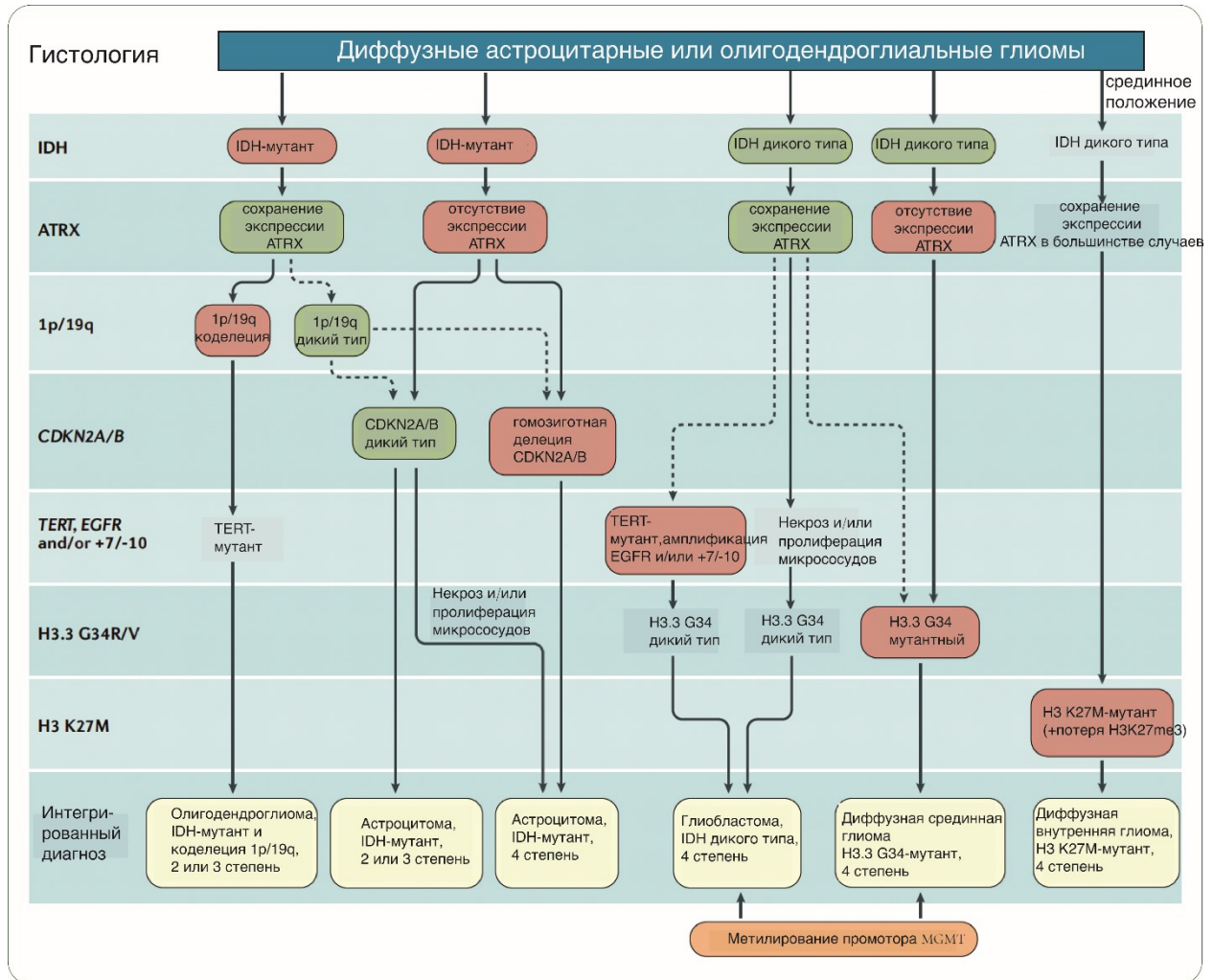


Рисунок 1. Классификация глиом. Изображение адаптировано с сайта <https://www.atlasantibodies.com> [24].

### 1.1.2. Внутриопухолевая гетерогенность глиом

В последние годы развитие таких технологий как микродиссекция с лазерным захватом, секвенирование отдельных клеток, вычислительная деконволюция массивных геномных данных позволили подтвердить гипотезу о внутриопухолевой генетической гетерогенности глиом. Так, с помощью секвенирования РНК единичных клеток показана разнонаправленная эволюция субклонов при глиобластоме с *IDH* дикого типа [25,26]. Кроме того, с использованием методов регионального секвенирования и одноядерного секвенирования ДНК обнаружены различные варианты последовательности гена *EGFR* (ген рецептора эпидермального фактора роста) в пределах одной опухоли [27–29].

Одной из основ принципа гетерогенности глиом является концепция стволовых опухолевых клеток (СОК), которая также внесла определенную ясность в понимание механизмов резистентности глиом и возникновения рецидивов опухоли. СОК

характеризуются хромосомной нестабильностью, что подчеркивает роль клональной эволюции в их распространении. Кроме того, способность СОК инициировать и поддерживать рост опухолей указывает на вероятность спонтанного образования опухоли вследствие приобретения и накопления клетками критических мутаций, обуславливающих появление фенотипа СОК [30]. Ранее для выявления СОК глиобластомы использовали определенные маркеры, а именно маркеры нейральных стволовых/прогениторных клеток (CD133, CD15, CD44, CD171 и др.) и эмбриональных стволовых клеток (SOX-2, с-Мус, OCT-4, NANOG) [31,32], предполагая, что СОК идентичны по набору данных молекул. Стоит отметить, что данный набор идентификаторов СОК является неперекрывающимся и вариабельно экспрессируемым опухолевыми клетками со свойствами стволовости. Однако общие свойства СОК всё же могут зависеть от особенностей функционирования совокупности основных факторов транскрипции и регуляторов хроматина, определяющих их эпигенетический/транскрипционный статус [33].

Помимо онкотрансформированных клеток в опухоли присутствуют нормальные и реактивные астроциты, опухоль-ассоциированные макрофаги, миелоидные клетки, фибробласты, иммунные клетки и нейральные стволовые клетки [34].

Метаболические изменения микроокружения опухоли также являются причиной как поддержания роста опухоли, так и канцерогенеза. Активные формы кислорода путем диффузии проникают в клетки стромы, что приводит к окислительному стрессу и дальнейшей активации транскрипционных факторов HIF-1 (фактор, индуцируемый гипоксией 1) и NF- $\kappa$ B (ядерный фактор  $\kappa$ B), играющих важную роль при оксидативном стрессе, в стромальных клетках. Активация данных транскрипционных факторов обуславливает индукцию ангиогенеза [35,36], что способствует поддержанию и расширению сосудистой сети опухоли [37].

Основные иммуносупрессивные клетки, входящие в микроокружение опухоли, представлены опухоль-ассоциированными макрофагами (tumor-associated macrophages (TAMs)), супрессорными клетками миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells (MDSC)), Т-регуляторными клетками (regulatory T cells (Treg)) и натуральными киллерами (Natural killer cells (NK cells)). Известно, что TAMs способствуют поддержанию фенотипа СОК и их пролиферации, а также оказывают влияние на строму и кровеносные сосуды опухоли, что обуславливает повышение ее инвазивности и лекарственной резистентности. MDSC могут ингибировать пролиферацию и активность Т-клеток за счет генерации активных форм кислорода, секреции трансформирующего фактора роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) и циклооксигеназы-2. Treg, в свою очередь, секретируют IL-10, IL-35 и TGF- $\beta$ , опосредуя иммуносупрессию. Другие стромальные клетки микроокружения

опухоли представлены опухоль-ассоциированными фибробластами (cancer-associated fibroblast, CAF) и нейтрофилами. CAF - это гетерогенная популяция клеток, которые секретируют факторы роста, ферменты и компоненты внеклеточного матрикса, таким образом способствуя росту опухоли и поддержанию инвазивного потенциала СОК. Нейтрофилы, помимо регуляции пролиферации СОК, способны участвовать в формировании устойчивости опухоли к действию антиангиогенных препаратов [11].

Кроме того, важным компонентом опухолевого микроокружения является внеклеточный матрикс, который также вносит вклад в устойчивость глиобластомы к традиционной противоопухолевой терапии за счет секреции факторов роста, которые приводят к пролиферации СОК. В матриксе глиобластомы представлены белки ламинины, которые влияют на рост опухолевых клеток, и интегрины, играющие значимую роль в самообновлении СОК [38].

Таким образом, опухолевая масса включает в себя различные типы клеток и биологически-активных молекул, тесная взаимосвязь которых обеспечивает не только развитие и прогрессирование опухоли, но и обуславливает эффективность противоопухолевой терапии.

### 1.1.3. Молекулярные подтипы глиом

Современный подход к терапии злокачественных новообразований, в том числе глиом, основывается на индивидуальных характеристиках опухоли и определяется, в том числе, особенностями экспрессии генов, генетическими мутациями и уровнем метилирования ДНК опухолевых клеток. Данные характеристики играют решающую роль в ответе опухоли на терапию и имеют важное прогностическое значение.

При развитии глиом, как и других неоплазм, происходит как активация протоонкогенов (*EGFR*, *PDGFRA*, *MET*, *RBI*, *MDM2* и другие), так и инактивация генов-супрессоров опухолей (*TP53*, *PTEN* и другие) [39]. Однако долгое время основным прогностическим фактором являлся IDH-статус опухоли.

IDH участвуют в таких метаболических процессах, как цикл Кребса, метаболизм глутамина, липогенез и регуляция окислительно-восстановительного потенциала [40]. Существует три изоформы данного фермента: IDH1, IDH2 и IDH3, кодируемых разными генами. При этом, NADP-зависимые IDH1 и IDH2 характеризуются значительным сходством последовательностей (70%) и почти идентичной структурой белка [41]. Точечные мутации в кодоне 132 гена *IDH1*, возникающие в глиомах, являются гетерозиготными и соматическими и характеризуются заменой гуанина на аденин, что

ведет к замене аргинина в позиции 132 на гистидин (R132H) [40]. Мутации в гене *IDH2* приводят к замене аргинина в 172 или 140 положениях [40]. Поскольку продукты описанных генов являются ключевыми ферментами цикла трикарбоновых кислот, то любые существенные мутации ведут к задержке цикла и вызывают накопление онкометаболита 2-гидроксиглутарата [42]. Было показано, что мутации в генах *IDH* коррелируют с благоприятным прогнозом и высокими показателями выживаемости пациентов [43]. Однако в настоящее время IDH-статус не является абсолютным показателем. Согласно пятому изданию классификации ЦНС ВОЗ, о котором было упомянуто ранее, для идентификации глиобластомы при наличии *IDH* дикого типа необходимы исследования мутации промотора гена *TERT*, амплификации гена *EGFR* и изменения числа копий хромосом 7 и 10 (+7/-10) [14].

Другим важным прогностическим и предиктивным фактором является метилирование промотора гена *MGMT*. Фермент Об-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза (MGMT) участвует в репарации ДНК, удаляя алкильные группы в Об и N6 положениях гуанина [44]. Активность данного белка в опухолевых клетках снижает терапевтический эффект алкилирующих противоопухолевых средств, таких как темозоломид [45]. Таким образом, метилирование промотора *MGMT* коррелирует с позитивным прогнозом выживаемости пациентов и ответом не только на терапию темозоломидом, но на радиотерапию [46].

Классификация глиом 4 степени злокачественности на молекулярные подтипы основана на транскрипционном профиле опухолей. Наиболее распространённой является предложенная в 2010 году Verhaak и соавторами классификация, включающая пронеуральный, нейральный, классический и мезенхимальный подтипы [47]. Пронеуральный подтип встречается у молодых пациентов, и опухоли этого подтипа характеризуются высоким уровнем экспрессии гена *PDGFRA* (рецептор тромбоцитарного фактора роста A) и мутациями в гене *IDH1* и, соответственно, более благоприятным прогнозом для пациентов. Для нейрального подтипа выделяют маркеры *SYTI* (синаптоагмин-1), *SLC12A5* (член 5 12-го семейства транспортеров растворенных веществ), *GABRA1* (субъединица альфа-1 рецептора гамма-аминомасляной кислоты) и *NEFL* (легкая цепь нейрофиламента). Для глиом классического подтипа характерны хромосомные aberrации, в частности потеря 7 хромосомы, амплификация 10 хромосомы, гомозиготная делеция 9p21.3 и инактивация RB (белок ретинобластомы)-пути. Кроме того, в опухолях этого подтипа гиперактивированы сигнальные пути Sonic hedgehog и Notch. Мезенхимальный подтип определяется мутациями в генах-супрессорах опухолей *NF1*, *TP53*, *PTEN*, отсутствием амплификации гена *EGFR* по сравнению с остальными подтипами

глиобластомы, высокой экспрессией генов надсемейства факторов некроза опухоли и пути NF- $\kappa$ B и неблагоприятным прогнозом заболевания. Кроме того, при мезенхимальном подтипе опухоли в клетках активированы специфические гены, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом, сигнальными путями PI3K/Akt1 (фосфоинозитид-3-киназа/серин-треонин киназа 1), MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа), ERK (киназа, регулируемая внеклеточным сигналом) и Wnt [48].

Описанные выше молекулярные особенности глиом являются важными характеристиками опухоли, которые необходимо учитывать, как при постановке диагноза, так и при подборе терапии. Кроме того, понимание молекулярной биологии опухоли позволяет разработать более эффективные стратегии лечения, основанные на таргетном воздействии на определенные молекулы, являющиеся специфичными для отдельных подтипов глиомы.

## **1.2. Терапия глиом**

### **1.2.1. Хирургическая резекция глиом**

Основное лечение глиобластомы на сегодняшний день основано на комбинировании максимальной хирургической резекции, радио- и химиотерапии. Удаление опухоли позволяет снизить масс-эффект, а также получить ткань для последующего гистологического анализа и характеристики на уровне молекулярных маркеров для постановки точного диагноза [49]. Хотя максимальное удаление опухолевой ткани позволяет повысить выживаемость пациентов [50], существуют ограничения в достижении такой степени резекции, связанные с диффузным распространением злокачественных клеток. Для визуализации инфильтрирующих глиом используют различные способы как преоперационного, так и интраоперационного мониторинга [51]. Однако даже при максимальной хирургической резекции возникают рецидивы, поскольку клетки глиом способны мигрировать в отдаленные отделы мозга, а также образовывать экстракраниальные метастазы [52].

### **1.2.2. Радиотерапия глиом**

Адювантная радиотерапия опухолей головного мозга направлена на снижение рисков рецидива и повышение выживаемости пациентов с глиобластомой после хирургического вмешательства. Радиотерапевтические методы включают дистанционную, 3D-конформную, модулированную по интенсивности и стереотаксическую лучевую

терапию [53]. Также в настоящее время приобретает широкое распространение подход, основанный на облучении тяжелыми ионами [54]. Данный подход обеспечивает лучшее распределение дозы по объему тканей. Кроме того, было показано, что при применении углеродной ионной терапии снижается экспрессия гена *VEGF* (фактор роста эндотелия сосудов) в клетках микроокружения глиомы в сравнении с рентгеновским облучением [55]. Поскольку VEGF участвует в регуляции миграции клеток [56], применение данного метода лучевой терапии снижает риски метастазирования и рецидивов глиом. Однако, учитывая формирование радиорезистентности опухоли, необходимо применять комбинации препаратов совместно с любыми методами лучевого воздействия.

### 1.2.3. Химиотерапия глиом

Стандартным адъювантным химиопрепаратом для терапии глиобластомы является темозоломид (ТМЗ), одобренный к применению в клинике в 2005 году [5]. ТМЗ является имидазотетразиновым производным алкилирующего агента дакарбазина, при физиологическом pH препарат гидролизуется до короткоживущих активных компонентов ((5-(3-метилтриазен-1-ил)-имидазол-4-карбоксамид), МТИС) (Рисунок 2) [57]. ТМЗ метилирует геномную ДНК по положениям N7 и O6 гуанина и O3 аденина, что в конечном итоге приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу.

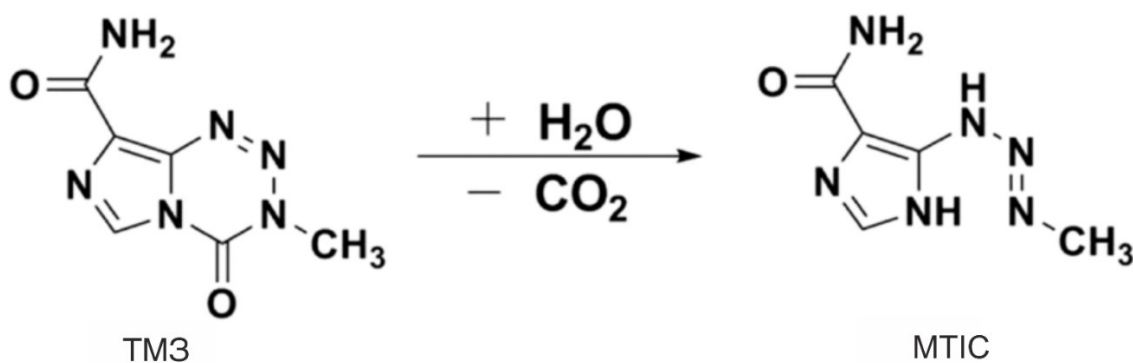


Рисунок 2. Химическая структура ТМЗ и МТИС. Адаптировано с [58].

Как было упомянуто ранее, эффективность действия темозоломида в опухолевых клетках зависит от активности MGMT, восстанавливающей алкилированные аддукты ДНК. O6-MeG при репликации ДНК образует пару с тиминном вместо цитозина, что при низком уровне MGMT приводит к клеточной гибели. В свою очередь, MMR (система репарации “мисматчей”) распознает лишь неспаренный тимин в дочерней цепи, при этом O6-MeG остается в матричной. Дальнейшие циклы реинсерции и удаления тимина приводят к стойким разрывам нити ДНК, коллапсу репликативной вилки и остановке репликации [59].



Поскольку в клетках глиобластомы зачастую нарушены как процессы метилирования промотора *MGMT*, так и работа MMR, терапевтическое действие темозоломида может быть ограниченным.

Еще одним химиотерапевтическим способом лечения глиобластомы является PCV-режим. PCV представляет собой комбинацию прокарбазина (procarbazine), ломустина (CCNU) и винкристина (vincristine) [60]. Ломустин, производное нитрозомочевины, проявляет как алкилирующие, так и хлорэтилирующие свойства. Образующийся аддукт O6ClEtG химически нестабилен и подвергается внутримолекулярной перегруппировке с образованием межцепочечных поперечных связей N1-O6-этен гуанин и, наконец, N1-гуанин-N3-цитозин [61]. Поскольку O6ClEtG также является субстратом для *MGMT*, уровень данного фермента определяет эффективность терапии ломустином. Однако известно, что совместное действие прокарбазина, другого алкилирующего агента, и производного нитрозомочевины приводит к снижению активности *MGMT*.

Винкрисдин относится к группе алкалоидных препаратов, получаемых из барвинка (вида *Vinca rosea*) [62]. Винкрисдин связывает тубулин и ингибирует образование микротрубочек, что приводит к остановке митоза. Кроме того, винкрисдин тормозит синтез белков и нуклеиновых кислот, блокируя утилизацию глутаминовой кислоты [63]. Совместное применение винкристина, прокарбазина и ломустина в сочетании с радиотерапией позволяет достичь антинеопластического эффекта. Однако, нейротоксичность такой комбинации имеет синергический эффект [64].

#### **1.2.4. Иммунотерапия глиом**

Иммунотерапевтический подход основан на индукции или усилении иммунного ответа организма в отношении опухолевых клеток. Иммунотерапия включает инъекции эффекторных иммунных клеток, иммуностимуляторов, противоопухолевых вакцин и ингибиторов контрольных точек иммунитета (Рисунок 3) [65].

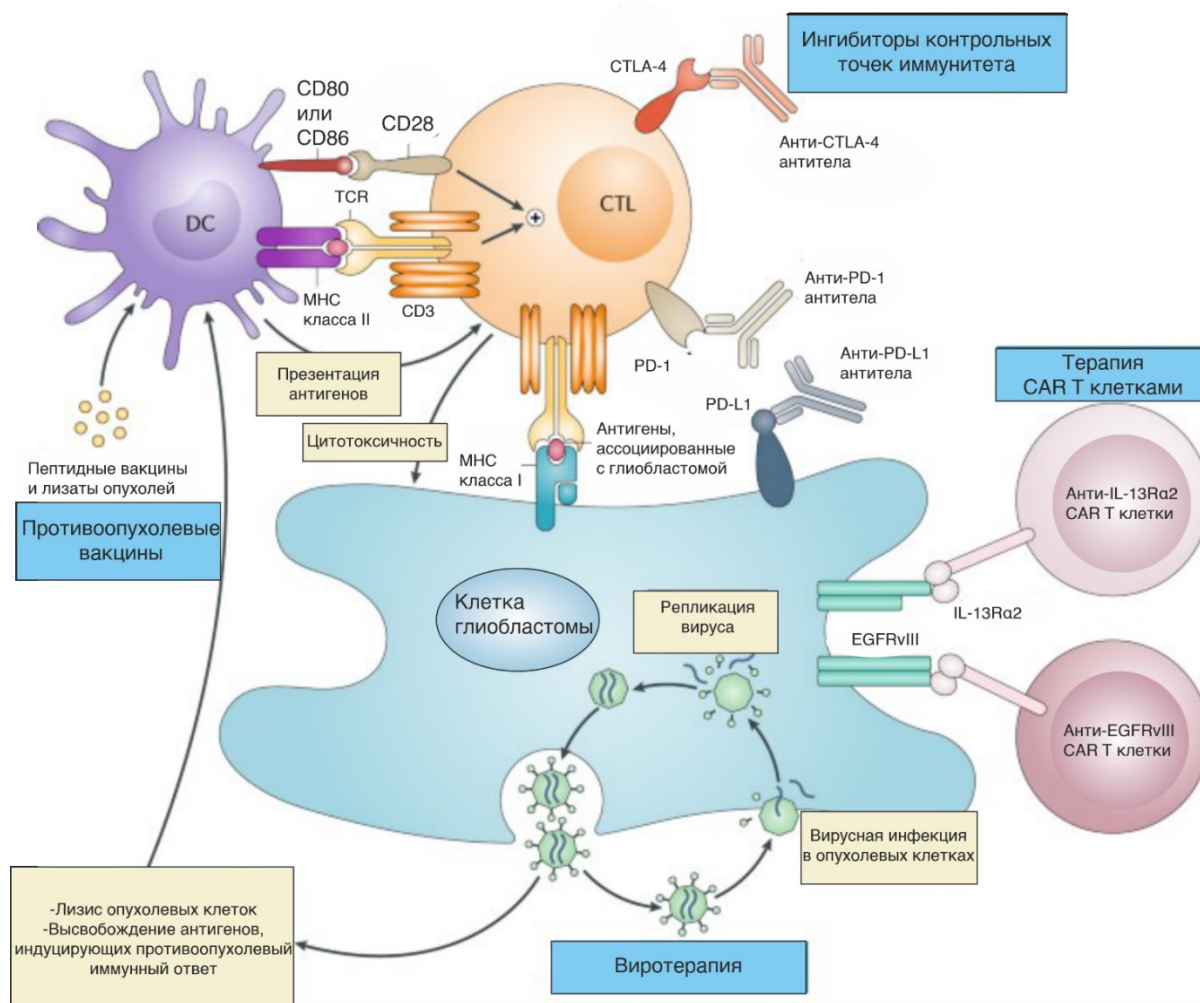


Рисунок 3. Иммунотерапевтические подходы в терапии глиобластомы. Адаптировано с [66].

#### 1.2.4.1. Ингибиторы контрольных точек иммунитета

Чекпойнт-ингибиторы (или ингибиторы контрольных точек иммунитета) в нормальных условиях предназначены для предотвращения аутоиммунного поражения тканей. Опухолевые клетки способны использовать данные механизмы для уклонения от действия иммунной системы. Например, экспрессия PD-L1 (лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1) в клетках глиобластомы ведет к подавлению активности Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности рецепторы PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели 1), соответствующие лиганду [67]. PD-L1, экспрессируемый антигенпрезентирующими клетками, В-лимфоцитами и клетками паренхимы, является молекулой иммунного контроля и относится к семейству трансмембранных белков B7 первого типа. Уровень PD-L1 связан с инвазивностью и агрессивностью глиобластомы [68]. Кроме того, опухолевые клетки способны регулировать уклонение от иммунного ответа за счет своего микроокружения. Клетки глиом, в свою

очередь, индуцируют экспрессию PD-1 и PD-L1 опухоль-ассоциированными макрофагами [69]. Таким образом, использование ингибиторов PD-1/PD-L1-пути может быть эффективной стратегией терапии глиом.

Другой молекулой, контролирующей иммунную систему, является CTLA-4 (гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4). CTLA-4, представленный на поверхности Т-клеток, конкурирует с CD28 (кластер дифференцировки 28) за связывание ко-стимулирующих молекул CD80 (кластер дифференцировки 80) и CD86 (кластер дифференцировки 86) на антигенпрезентирующих клетках, тем самым ингибируя активацию Т-лимфоцитов [70]. Применение в клинике анти-CTLA-4 антител для лечения глиобластомы как в монотерапии, так и в комбинации с другими терапевтическими подходами на сегодняшний день не одобрено из-за возникновения нежелательных токсических эффектов [71].

#### 1.2.4.2. Противоопухолевые вакцины

Противоопухолевая вакцинация включает в себя подходы с применением препаратов на основе аутологических и аллогенных немодифицированных и модифицированных опухолевых клеток, синтетические поливалентные вакцины и вакцины на основе дендритных клеток.

Пептидные вакцины позволяют активировать иммунную систему, нацеливая ее на отдельные антигены на поверхности опухолевых клеток. Мутантный вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII) представлен примерно в 40% глиобластом [72]. Вакцина риндопепимут (Rindopepimute) – это пептид EGFRvIII, конъюгированный с гемоцианином лимфы улитки (KHL). Первичные результаты исследования эффективности данного препарата были обнадеживающими: общая выживаемость пациентов составила 21,8 месяцев, а выживаемость без прогрессирования в течение 5,5 месяцев – 66% [73]. Однако последующее рандомизированное двойное слепое исследование не продемонстрировало какого-либо увеличения выживаемости и клинические испытания были прекращены [74].

Как известно, наиболее распространенная мутация при глиомах затрагивает ген *IDH1*. Было проведено многоцентровое, одностороннее, открытое исследование фазы I IDH1(R132H)-специфической пептидной вакцины (IDH1-vac) на пациентах с глиомами 3 и 4 степеней злокачественности, и показана безопасность данного препарата [75]. Другая вакцина IMMU-06 была испытана на пациентах с глиомами 2 степени злокачественности и также продемонстрировала безопасность и способность индуцировать противоопухолевый

иммунный ответ [76]. Данный подход к терапии глиом является перспективным и требует дальнейших исследований на пациентах, однако его применение нецелесообразно при глиомах с *IDH1* дикого типа, которые характеризуются менее благоприятным прогнозом для пациентов.

ГМ-КСФ-экспрессирующие вакцины также зарекомендовали себя как эффективные противоопухолевые средства. Гемопоетический цитокин ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) ответственен не только за продукцию и активацию гранулоцитов и макрофагов, но и за пролиферацию и активацию других участников иммунной системы [77]. Данный цитокин играет важную роль в развитии и созревании дендритных клеток, пролиферации и активации Т-лимфоцитов, что указывает на его связь с формированием врожденного и приобретённого иммунного ответа [78]. Эффект ГМ-КСФ в отношении глиом показан на моделях *in vivo* в комбинации с другими иммунотерапевтическими агентами [79,80]. Однако существуют и данные о том, что ГМ-КСФ вносит вклад в прогрессирование опухоли, влияя на пролиферацию опухолевых клеток [81,82]. При этом, активно проводят клинические испытания с участием препаратов, содержащих данный цитокин, например, NCT03615404, NCT03396575, NCT03334305 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Другим распространенным подходом в иммунотерапии является вакцинация дендритными клетками. Дендритные клетки (ДК) играют ключевую роль в формировании Т-клеточного иммунного ответа [83]. Принцип подобной вакцинации заключается в следующем: дендритные клетки нагружают опухоль-специфичными антигенами, затем ДК процессируют эти антигены и представляют эпитопы на своих молекулах МНС (главный комплекс гистосовместимости) на поверхности клетки. Такие «обученные» ДК вводят пациенту [84]. Традиционно, используемые для получения таких вакцин антигены те же, что и при вакцинации пептидами. Однако ДК могут быть нагружены опухолевыми лизатами, ДНК или РНК молекулами. Кроме того, использование ДК имеет ряд преимуществ, поскольку именно они играют центральную роль в формировании противоопухолевого иммунного ответа.

Помимо описанных выше методов противоопухолевой вакцинации используют также модифицированные опухолевые клетки. Наиболее часто для получения клеток, экспрессирующих иммуностимулирующие цитокины, например, описанный выше ГМ-КСФ, используют геномное редактирование [85].

#### 1.2.4.3. Онколитические вирусы в терапии глиом

История развития виротерапии, или терапии с помощью онколитических вирусов, берет свое начало с середины 19-го века, когда появляются первые упоминания о регрессии опухолей после перенесенных вирусных инфекций [86]. В 1950-1970 гг. проходят первые клинические испытания репликативно-компетентных онколитических вирусов. Однако в 1980-х гг. подобные эксперименты были прекращены. Основными причинами являлось непонимание молекулярных механизмов действия вирусов и технологические сложности при получении высокоочищенных препаратов [87]. Первый рекомбинантный онколитический вирус на основе вируса простого герпеса был сконструирован в 1991 году Мартузой и коллегами [88]. Полученный рекомбинантный штамм dlsptk несет делецию гена вирусной тимидинкиназы, что позволило снизить уровень репликации вируса в покоящихся клетках, таких как нейроны. Разработанный штамм продемонстрировал терапевтический потенциал при лечении глиом в исследованиях на животных. Однако делеция гена тимидинкиназы делала dlsptk устойчивым к противовирусным агентам, таким как ацикловир и ганцикловир, мишенью которых являются вирусные тимидинкиназы. Отсутствие восприимчивости к лекарственным препаратам препятствовало продвижению этого онколитического вируса в клинические испытания [88]. Однако это исследование открыло совершенно новую эпоху в изучении онколитических вирусов: генно-инженерные манипуляции с вирусными геномами позволили многократно увеличить селективность и противоопухолевую эффективность используемых вирусных агентов.

Помимо прямого лизиса опухолевых клеток, онколитические вирусы также способны индуцировать противоопухолевый иммунный ответ (Рисунок 4). Высвобождение опухоль-ассоциированных антигенов в процессе лизиса клеток ведет к их распознаванию компонентами иммунной системы и привлечению к опухоли активированных иммунных клеток [89].

На сегодняшний день различные онколитические вирусы проходят доклинические и клинические испытания в качестве средств терапии глиом.

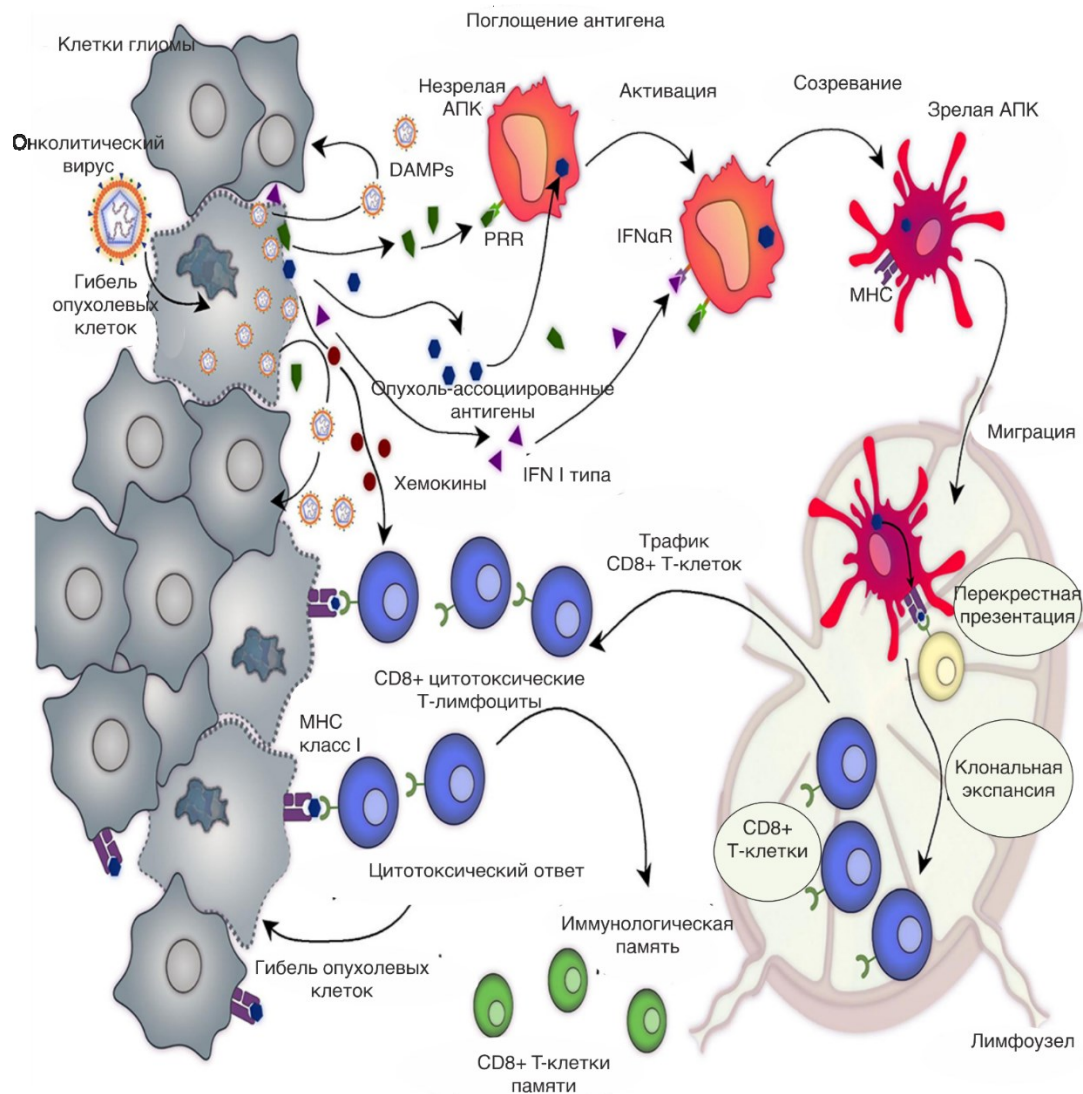


Рисунок 4. Механизмы онколитического действия вирусов. Адаптировано с [89].

#### 1.2.4.3.1. Вирус простого герпеса I типа

В силу своей высокой литической активности вирус простого герпеса I типа (HSV-1) являются наиболее широко используемым в иммунотерапии опухолей. Большинство онколитических штаммов HSV-1 несут делецию гена нейровирулентности ICP34.5 [90].

Самым ярким представителем семейства герпесвирусов является одобренный в 2015 году TVEC (Talimogene laherparepvec, Imlygic) для лечения меланомы. TVEC разработан на основе генетически модифицированного HSV-1 и несет трансген человеческого ГМ-КСФ, встроенный в район частичной делеции гена ICP34.5 (белок инфицированной клетки 34.5). Делеция в гене ICP34.5 лишает вирус способности к репликации в нормальных клетках. ГМ-КСФ способствует привлечению дендритных клеток и усиливает функцию антигенпрезентирующих клеток. Кроме того, для снижения

вирулентности в геноме TVEC существует дополнительная делеция ICP47 (белок инфицированной клетки 47) [91]. Помимо применения для лечения меланомы, проходят исследования эффективности TVEC в отношении других злокачественных образований, однако, глиобластома не входит в список исследуемых нозологий.

В геноме другого онколитического HSV-1 G207 помимо делеции ICP34.5 путем инсерции *lacZ* гена *E. coli* инактивирован ген ICP6 (белок инфицированной клетки 6), который кодирует аналог клеточной рибонуклеотидредуктазы. Данная модификация ограничивает репликацию вируса в нормально делящихся клетках [92]. Доклинические испытания G207 демонстрируют его безопасность и отсутствие нейровирулентности. Кроме того, при использовании G207 в комбинации с радиотерапией 6 из 9 пациентов имели положительный ответ на лечение [93–95].

G47Δ, также известный как Делитакт (Delytact), представляет собой модифицированный онколитический вирус G207 с дополнительной делецией гена ICP47, которая усиливает презентацию МНС-I на инфицированных клетках [7]. Согласно данным II фазы клинических испытаний данного препарата с выборкой из 13 пациентов с глиобластомой, серьезные нежелательные явления (СНЯ) проявлялись лишь у двоих, при этом 1-летняя выживаемость составила 92,3% по сравнению с 15% в контрольной группе [96]. Доклинические исследования G47Δ в комбинации с анти-CTLA-4 иммунотерапией на различных сингенных мышинных моделях демонстрируют синергический противоопухолевый эффект [97]. На данный момент Делитакт является единственным в мире препаратом на основе онколитического вируса, одобренным в Японии для лечения пациентов с глиобластомой [7].

#### 1.2.4.3.2. Аденовирусы

Аденовирус 5-го серотипа (Ad5) является наиболее изученным и широко применяемым для создания вакцин и векторов для генной терапии [98]. Первым генетически модифицированным онколитическим аденовирусом стал Onyx-015, созданный на основе химеры 2-го и 5-го серотипов [99]. Делеция E1B локуса ведёт к ограничению способности вируса размножаться в здоровых клетках. Продукт E1B белок E1B-55kD связывает p53, ингибируя тем самым p53-зависимый апоптоз, при этом в опухолевых клетках, зачастую имеющих нарушения апоптотических путей, вирус способен реплицироваться. Кроме того, Onyx-015 успешно размножается в опухолевых клетках с p53 дикого типа [100]. Однако из-за недостаточной эффективности препарата по результатам III фазы клинических испытаний исследования Onyx-015 в США были прекращены.

Delta-24 – штамм условно реплицирующегося аденовируса 5-го серотипа второго поколения. Частичная делеция гена E1A, продукт которого связывает белок Rb, позволяет вирусу селективно реплицироваться в Rb-дефицитных опухолевых клетках [101]. Кроме того, модификация данного вируса с включением пептида Arg-Gly-Asp (RGD) облегчает его проникновение в клетки глиом за счет взаимодействия с  $\alpha_v$  интегринами опухолевых клеток [102].

Однако частичная делеция E1A не позволяет в полной мере уменьшить токсические последствия накопления E1A-белка в нормальных клетках. Для решения данной проблемы был разработан рекомбинантный аденовирус ICOVIR-5, в геном которого встроены зависимый от фазы клеточного цикла промотор E2F-1 в качестве регуляторного промотора для гена E1A [103]. Благодаря этому быстроделющиеся опухолевые клетки в большей степени экспрессируют E1A под контролем промотора E2F-1 по сравнению с нормальными клетками. Дальнейшие модификации ICOVIR-5 демонстрируют обнадеживающие результаты в доклинических исследованиях. Например, внесение дополнительных палиндромных последовательностей в промотор гена E2F-1 повысило селективность рекомбинантного вируса в отношении опухолевых клеток [104].

Ещё одним перспективным аденовирусом на сегодняшний день является Ad-RTS-IL-12. Экспрессия mIL-12 (интерлейкин 12 мыши) активирует CD4 и CD8 специфический противоопухолевый ответ. При этом экспрессия цитокина возможна лишь в присутствии веледимекса [105]. Веледимекс представляет собой синтетический аналог экдизона (гормон, стимулирующий линьку у насекомых), стимулятор экспрессии интерлейкина-12. В первой фазе клинических испытаний такая комбинация продемонстрировала безопасность и обнадеживающие результаты по эффективности [106].

#### 1.2.4.3.3. Парвовирусы

При разработке препаратов на основе парвовирусов используют непатогенный для человека штамм протопарвовируса крысы H-1, известный как H-1PV [107]. Предполагают, что H-1PV вызывает гибель клеток глиом, устойчивых к цисплатину, индуцируя агрегацию катепсинов В и L и снижая экспрессию их ингибиторов, цистатинов В и С [108]. Клинические испытания продемонстрировали безопасность ParvOryx01, препарата на основе H-1PV, и его способность проникать через ГЭБ (гематоэнцефалический барьер) при внутривенном введении [109]. Также у пациентов отмечено повышение уровня инфильтрирующих опухоль цитотоксических Т-клеток, индукция катепсина В и экспрессия IFN- $\gamma$  (интерферон  $\gamma$ ) и IL-2 (интерлейкин 2) [110].



#### 1.2.4.3.4. Вирус болезни Ньюкасла

Вирус болезни Ньюкасла (NDV) специфичен для птиц и не патогенен для человека, при этом его таргентность к опухолевым клеткам плохо изучена. Однако считают, что высокий уровень Ras1 (малая ГТФаза I семейства Ras) в онкотрансформированных клетках способствует успешной репликации NDV [111]. В доклинических исследованиях отмечено увеличение выживаемости животных-опухоленосителей при лечении NDV [112], а также синергический эффект комбинации с темозоламидом [113]. В немногочисленных клинических исследованиях, получены крайне многообещающие результаты. Чатари и его коллеги сообщают об увеличении выживаемости пациентов до 5 - 9 лет [114], а при исследовании штамма OV001/HUJ показана полная регрессия глиобластомы у одного пациента [115].

#### 1.2.4.3.5. Вирус осповакцины

Основным преимуществом вируса осповакцины является его естественный тропизм к клеткам тканей различного гистогенеза за счет отсутствия зависимости от специфических рецепторов для проникновения в клетку [116]. Основные стратегии по усилению онколитического действия вируса осповакцины заключаются во введении в вирусный геном последовательностей, кодирующих апоптоз индуцирующие белки, а также белки, ответственные за рекрутинг иммунных клеток и усиливающие противоопухолевый иммунный ответ.

Одним из наиболее известных и исследуемых в качестве средства для терапии злокачественных новообразований рекомбинантных штаммов вируса осповакцины является JX-594, или Pexa-Ves. Этот модифицированный штамм несёт делецию гена вирусной тимидинкиназы и инсерции генов, экспрессирующих ГМ-КСФ человека и  $\beta$ -галактозидазу *E. coli*, под контролем синтетических ранних/поздних и p7.5 промоторов, соответственно [117]. Инактивация гена тимидинкиназы делает репликацию вируса зависимой от высокой активности тимидинкиназы в клетке, что является характерной чертой опухолевых клеток. Было показано, что вакцинные штаммы вируса осповакцины обладают способностью активно реплицироваться в опухолевых клетках. Это может быть связано с тем, что многие изменения, обусловленные злокачественной трансформацией клетки (например, нарушения функционирования апоптотических путей, нарушения регуляции клеточного цикла, приобретение способности уходить от иммунологического надзора), также обеспечивают оптимальные условия для успешной репликации вируса.

Кроме того, репликация и диссеминация вируса осповакцины зависит от передачи сигналов от рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), сигнального пути, который гиперактивирован в большинстве опухолей [118].

Механизм действия Реха-Вес исследован в многочисленных доклинических и клинических испытаниях [119]. Нозологии применения Реха-Вес в клинических исследованиях включают гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рак молочной железы и другие солидные опухоли. Препарат продемонстрировал безопасность при различных способах введения, однако, разрешение к применению в клинике ещё не получено.

При этом другие рекомбинантные штаммы вируса осповакцины находятся в доклинических и на различных стадиях клинических испытаний. Например, рекомбинант rVV-p53 продемонстрировал высокую способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [120], а его комбинация с rVV-mIL12, экспрессирующим IL-12, значительно повышает выраженность иммунного ответа в исследованиях на животных [121].

Рекомбинантный штамм TG6002 несет делеции генов вирусных тимидинкиназы и рибонуклеотидредуктазы, что повышает его тропность к опухолевым клеткам. Кроме того, в геном этого вируса встроена последовательность FCU1 (fusion suicide gene), кодирующая цитозин дезаминазу и урацил фосфорибозилтрансферазу. Данные соединения трансформируют про-лекарство (5-FC) в цитотоксичные 5-фторурацил и 5-фторуридинмонофосфат (5-FUMP). Была проведена IIа фаза клинических испытаний данного препарата (NCT03294486), однако, результаты не были опубликованы.

Перспективным препаратом для терапии глиобластомы является также рекомбинант VV-GMCSF-Lact. Разработанный на основе штамма Л-ИБП (штамм VACV, институт профилактической медицины Листера) вируса осповакцины, VV-GMCSF-Lact несет делеции фрагментов генов вирусных тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены гены ГМ-КСФ и апоптоз-индуцирующего белка лактапина, соответственно [122]. Лактапин представляет собой протеолитический фрагмент каппа-казеина молока человека и обладает онкотоксической активностью. Экспрессируемый VV-GMCSF-Lact лактапин индуцирует апоптоз опухолевых клеток по митохондриальному пути [123]. В настоящее время проходят клинические испытания 1-ой фазы данного онколитического вируса в качестве средства для терапии рака молочной железы, в том числе с трижды-негативным фенотипом (NCT05376527, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Кроме того, в доклинических исследованиях показана высокая цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы человека U87 MG как *in vitro*, так и *in vivo*.

Наряду с описанными онколитическими вирусами, исследуемыми в качестве противоопухолевых средств для лечения глиом, существует ещё множество препаратов на основе вирусов упомянутых и других семейств, которые находятся на разных стадиях клинических испытаний (Таблица 1).

Таблица 1. Данные с сайта [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), отражающие состояние клинических испытаний онколитических вирусов в качестве средств терапии глиом.

Препарат	Фаза испытаний	Статус	Идентификатор clinicaltrials.gov	Результаты предыдущей фазы (при наличии)
Ad-TD-nsIL12 (аденовирус)	I	Набор пациентов	NCT05717712	
rQNestin (вирус простого герпеса I тип)+циклофосфамид	I	Набор пациентов	NCT03152318	
G207 (вирус простого герпеса I тип)+радиотерапия	II	Набор пациентов завершен	NCT04482933	По данным I фазы клинических испытаний, препарат обладает низкой токсичностью, безопасен
M032 (вирус простого герпеса I тип)+пембролизумаб	I/II	Проведение испытаний	NCT05084430	
C134 (вирус простого герпеса I тип)	I	Проведение испытаний	NCT03657576	
Ad5-DNX-2401 (аденовирус)	I	Набор пациентов	NCT03896568	
PVSRIPO (рекомбинантный полиовирус)	I	Проведение испытаний	NCT02986178	
NSC-CRAd-S-pk7 (аденовирус)	I	Набор пациентов	NCT05139056	По данным I фазы клинических испытаний в комбинации с радио и химиотерапией, препарат обладает низкой токсичностью, безопасен. Зафиксировано увеличение выживаемости пациентов

#### 1.2.4.3.6. Виротерапия глиом в России

В России исследования противоопухолевого потенциала онколитических вирусов были начаты в 1960-1970 годах профессором М.К. Ворошиловой. Ее работы продемонстрировали серьезные успехи при применении вирусов для терапии: в ряде случаев наблюдалось полное исчезновение первичной опухоли и метастазов [87].

На сегодняшний день российские исследователи оценивают противоопухолевый потенциал разнообразных вирусов (энтеровирусы, вирус болезни Ньюкасла, аденовирусы, вирус осповакцины и другие) в отношении злокачественных новообразований самых разных нозологий, в том числе опухолей головного мозга [124]. В частности, научная группа под руководством профессора Чумакова П.М. активно изучает онколитические свойства энтеровирусов (род семейства пикорнавирусов) [125]. При исследовании 6 непатогенных штаммов энтеровирусов, изолированных от здоровых пациентов, было показано, что полученные штаммы способны ингибировать формирование нейросфер клетками персонализированных культур глиом [126], а внутривенное введение вируса Коксаки А7 иммунодефицитным животным-опухоленосителям приводит к полной элиминации подкожно трансплантированных глиом [127].

Другая группа исследователей под руководством академика В.П. Чехонина показала, что полиовирус 3 серотипа эффективно ингибирует рост ортотопически трансплантированной глиомы С6 крысы, клетки которой экспрессируют человеческий рецептор к полиовирусу [128].

Аденовирусы – еще одно вирусное семейство, онколитические свойства которых активно исследуются в России. Так, например, Романенко и соавторы показали снижение жизнеспособности клеток глиобластомы U87 MG *in vitro* и ингибирование роста подкожно трансплантированных опухолей под действием аденовирусов 5 и 6 серотипов [129]. При этом, опухоль быстрее отвечала на терапию Ad6. В работе Степаненко и его коллег также показана цитотоксическая активность различных рекомбинантов аденовируса 5 серотипа в отношении клеток персонализированных линий глиом *in vitro* и увеличение продолжительности жизни животных с интракраниально трансплантированной глиомой GL261 мыши [130].

Вирус осповакцины также является популярной платформой для разработки противоопухолевых лекарственных средств. Например, рекомбинантный вирус осповакцины, несущий трансген апоптоина - белка, индуцирующего апоптоз опухолевых клеток, обладает цитотоксической активностью в том числе и в отношении клеток глиобластомы [131]. Вирус осповакцины, усиленный трансгеном NS1 (онкотоксический

белок парвовируса Н-1) способен ингибировать развитие опухолей U87 MG, ортотопически трансплантированных мышам линии SCID [132].

Описанные выше примеры разработок российских научных групп подтверждают, что виротерапия злокачественных новообразований, в том числе глиом, является быстро развивающимся направлением биомедицинских исследований с большим потенциалом применения в клинической онкологии, и необходимость дальнейших исследований в этой области не вызывает сомнений.

#### 1.2.4.3.7. Комбинация виротерапии и других терапевтических подходов

Несмотря на явные преимущества, виротерапия обладает определенными недостатками, которые необходимо учитывать при разработке терапевтических схем. Среди факторов, ограничивающих эффективность онколитических вирусов, можно выделить: способность опухоли избегать иммунного ответа, даже при дополнительной его индукции онколизиса; вязкость внеклеточного матрикса, влияющая на распространение вирусных частиц от клетки к клетке; наработка вируснейтрализующих антител, снижающих эффективность виротерапии при повторных инъекциях, и другие. Для минимизации данных ограничений онколитические вирусы могут быть использованы в комбинации с другими подходами (Рисунок 5), недостатки которых, в свою очередь, можно скомпенсировать с помощью виротерапии.

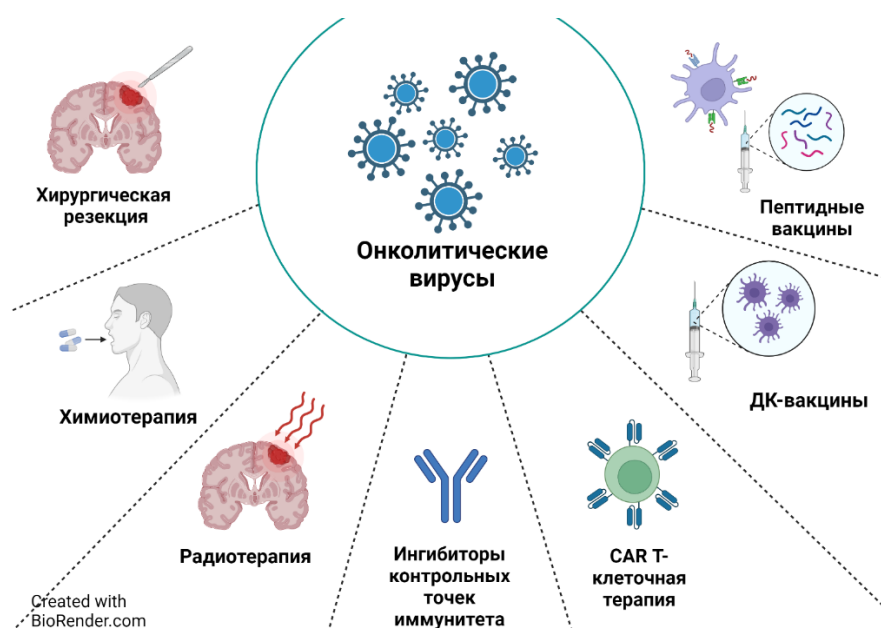


Рисунок 5. Терапевтические подходы, применяемые в сочетании с виротерапией для усиления противоопухолевого эффекта в отношении глиобластомы. Адаптировано с [133].

В первую очередь онколитические вирусы могут быть использованы для обработки резекционного поля в рамках проведения хирургического удаления опухоли. Данный способ позволяет минимизировать масс-эффект и уничтожить оставшиеся опухолевые клетки [134,135]. Кроме того, возможна комбинация онколитических вирусов с химиотерапевтическими препаратами, поскольку именно химиотерапия на сегодняшний день является основой современной терапии глиом. Однако клетки глиом, как и других опухолей, характеризуются формированием резистентности к химиотерапевтическим агентам [136], а онколитические вирусы могут влиять на механизмы репарации ДНК, увеличивая цитотоксический эффект химиопрепаратов [137]. Также показано, что совместное применение химиотерапии и виротерапии оказывает благотворное воздействие на индукцию иммунного ответа. Темозоламид, например, подавляет иммуносупрессивное окружение: снижает уровень Treg и миелоидных супрессорных клеток [138]. Циклофосфамид также способен оказывать угнетающее воздействие на Treg [139,140] и при низких дозах повышает эффективность виротерапии [141,142].

Радиотерапия, другой основной подход противоопухолевой терапии, как известно, может стать причиной рецидива опухоли, а также трансформации здоровых клеток и развития радиорезистентности опухолевых клеток [143]. Способность вирусов селективно заражать лишь опухолевые клетки позволила повысить эффективность радиотерапии за счет экспрессии вирусами симпортера йодида натрия – мембранного белка, участвующего в поглощении йодида клетками [144,145]. На модели глиомы C6 крысы показано повышение противоопухолевого эффекта при комбинации онколитического вируса осповакцины, экспрессирующего белок p53 человека, и радиотерапии [146]. В клинических испытаниях аденовируса DNX-2401 в комбинации с радиотерапией исследователям удалось достичь уменьшения или стабилизации объемов опухоли у пациентов до 18 лет с педиатрической диффузной внутренней глиомой моста (DIPG) [147].

Достижение синергического эффекта показано и для комбинации виротерапии с ингибиторами контрольных точек иммунитета. Поскольку онколитические вирусы могут опосредовать гиперактивацию PD-1/PD-L1-пути в опухолевых клетках [148], подобная комбинация может снизить потенциальную иммунную устойчивость к онколитической виротерапии. Кроме того, методы генетической инженерии позволяют конструировать вирусы, экспрессирующие ингибиторы PD-L1, что приводит, соответственно, к формированию опухоль-специфичного ответа Т-клеток [149]. В экспериментах *in vivo* Лю и соавторы показали, что при комбинации анти- PD-L1 и вируса осповакцины увеличивается продолжительность жизни животных с глиобластомой и количество активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухоли [150].

Кроме того, существуют работы, рассматривающие комбинированное действие ТМЗ и онколитических вирусов на различные типы опухолей. В некоторых публикациях сообщается, что виротерапия и химиотерапия ТМЗ обладают синергетическим эффектом [151,152]. В частности, Канаи и его коллеги показали, что вирус простого герпеса G47Δ в сочетании с ТМЗ эффективен против стволовых клеток глиомы [153]. Исследования того же вируса G47Δ, но модифицированного вставкой, кодирующей мышиный интерлейкин 12 (G47Δ-IL12), демонстрируют синергический эффект в отношении стволовых клеток глиомы мыши *in vitro*. Однако данные, полученные на модели *in vivo*, свидетельствуют о снижении и даже отсутствии эффекта [154].

Таким образом, онколитические вирусы могут быть использованы в комбинации с различными противоопухолевыми агентами. Помимо описанных выше исследований, существуют работы, согласно которым можно сделать вывод, что варианты комбинаций виротерапии и других терапевтических подходов практически не ограничены. Синергический эффект онколитических вирусов показан для таргетной терапии с ингибиторами mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих) и тирозинкиназных рецепторов [155,156], терапии иммунными клетками [157,158] и других подходов.

### **1.3. Механизмы резистентности глиом**

Одной из причин отсутствия значительного успеха в терапии опухолей, в частности глиом, является формирование устойчивости к противоопухолевым агентам. Существуют различные факторы, обуславливающие механизмы резистентности глиом к терапии, среди которых можно выделить гетерогенность опухоли и ее микроокружение, гипоксию, наличие атипичных некодирующих РНК, нарушения в регуляции клеточного цикла и системах репарации ДНК (Рисунок 6).



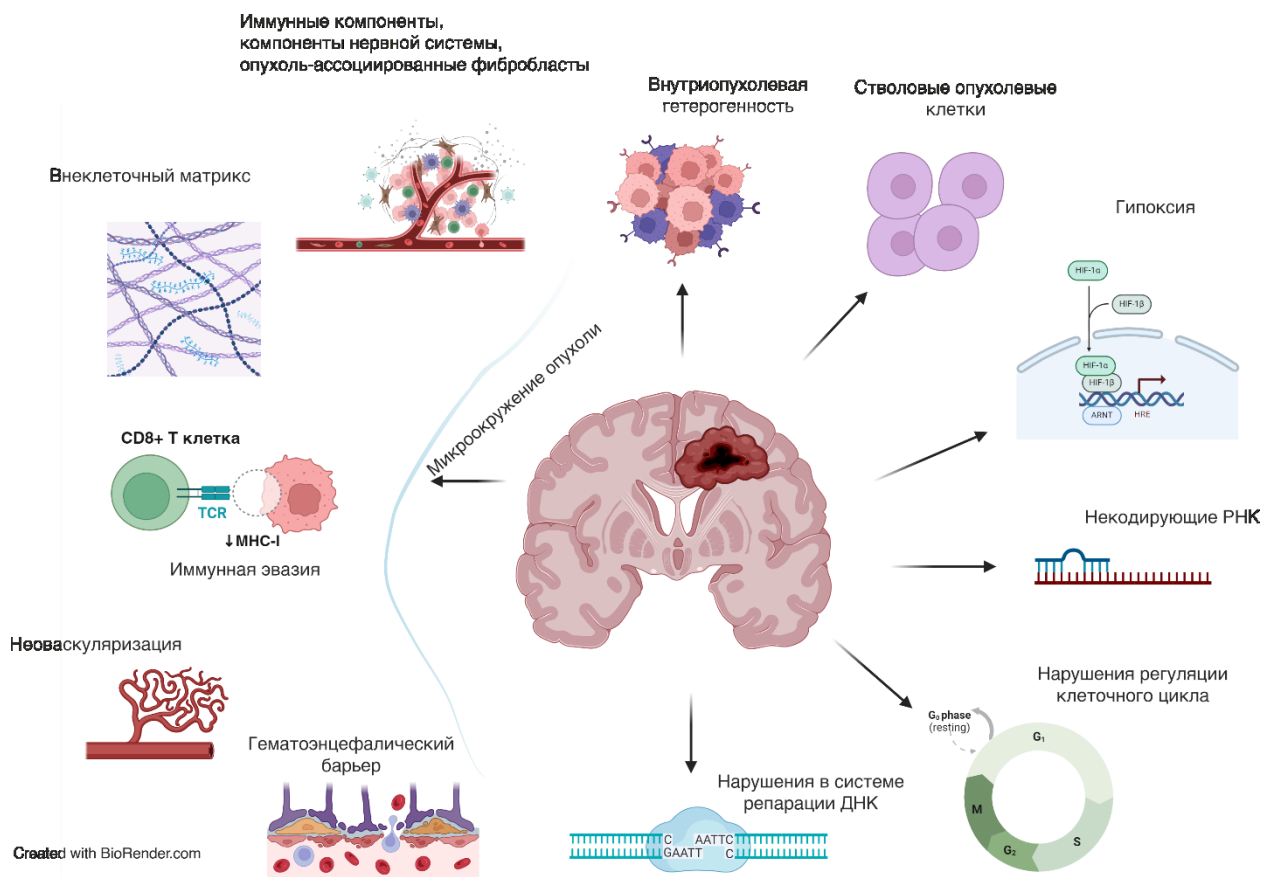


Рисунок 6. Основные факторы, обуславливающие формирование резистентности глиом к противоопухолевой терапии.

### 1.3.1. Резистентность глиом к радиотерапии

Влияние гипоксии на жизнедеятельность опухолевых клеток является объектом многочисленных исследований. В условиях гипоксии в развитие радиорезистентности вносят вклад различные процессы, включая механизмы регуляции клеточного цикла, ингибирование апоптоза и старения, регуляцию аутофагии и антиоксидантной/окислительно-восстановительной активности, что ведет к инвазии опухолевых клеток и приобретению свойств стволовости [159]. В частности, показано участие активируемого при гипоксии транскрипционного фактора HIF-1 и митогенного RAS-MEK-ERK сигнального пути в формирование радиорезистентности глиобластомы [160].

Микроокружение играет важную роль не только в развитии и поддержании опухоли, но и в ответе на терапию. Было показано, что облучение клеток глиомы,

трансплантированной животным, дает меньший противоопухолевый эффект, чем облучение тех же клеток *in vitro* [161,162]. Кроме того, Лью и соавторы при биоинформатическом анализе транскриптома клеток микроокружения обнаружили гены, которые связаны с устойчивостью опухоли к радиотерапии, и уровень экспрессии которых может иметь прогностическое значение [163].

Помимо микроокружения, в развитии опухоли и ее ответе на терапию ещё более важную роль играют и сами опухолевые клетки. Внутриопухолевая гетерогенность глиобластомы описывается иерархической моделью, предполагающей однонаправленную прогрессию от стволовых опухолевых клеток (СОК) к более дифференцированному потомству [164]. Генетическая нестабильность является одной из характеристик СОК, способствующих поддержанию их фенотипа и способности к самообновлению. Наиболее частые мутации затрагивают контрольные точки репликации, такие как p53, TERT (обратная транскриптаза теломеразы), ATRX (X-сцепленная альфа-талассемия с умственной отсталостью), NF1, CDKN2A (ингибитор циклинзависимой киназы 2A) и RB1 [39,165]. Кроме того, в клетках глиобластомы на высоком уровне происходит синтез белков, участвующих в репарации ДНК. В частности, показано, что СОК глиобластомы характеризуются высоким уровнем RAD51 (Гомолог 1 белка репарации ДНК), а использование его ингибиторов ведёт к снижению темпов репарации ДНК и повышает чувствительность к радиотерапии [166]. Кроме того, Де Бакко и коллеги сообщают, что MET (мезенхимально-эпителиальный переход) опосредует развитие резистентности СОК глиобластомы за счет активации киназы Aurora A, ATM-киназы и нижестоящих эффекторов репарации ДНК, а также фосфорилирования и удержания в цитоплазме белка p21, который выполняет антиапоптотические функции [167].

Различные микроРНК также могут вносить свой вклад в развитие радиорезистентности глиом. Например, miR-210 участвует в поддержании свойств стволовости опухолевых клеток и их адаптации к гипоксии, а также влияет на жизнеспособность клеток [168,169]. Нокдаун этой микроРНК увеличивает чувствительность клеток глиобластомы к радиотерапии [170]. С другой стороны, экспрессия некоторых микроРНК, наоборот, обуславливает радиочувствительность. Показано, что такими регуляторами могут быть miR-26a [171], miR-128 [172] и другие.

### 1.3.2. Резистентность глиом к химиотерапии

Химиопрепараты играют важную роль в терапии опухолей, в частности глиом. Однако, опухолевые клетки способны уклоняться от действия различных лекарственных

агентов. Механизмы, определяющие формирование устойчивости, многочисленны и включают наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), опухолевое микроокружение, внеклеточный матрикс, ангиогенез, нарушения в апоптотических каскадах и другие [136].

ГЭБ является физическим препятствием для успешной доставки препаратов для лечения опухолей головного мозга. ГЭБ состоит из специализированных эндотелиальных клеток капилляров, соединенных между собой плотными контактами, сформированными клаудинами, окклюдинами и соединительными адгезионными молекулами. С этими эндотелиальными клетками за счет общей базальной мембраны тесно связаны астроциты, перициты и нейроны, которые вместе составляют нервно-сосудистую единицу, отвечающую за поддержание биохимического и физического гомеостаза нормального мозга [173]. Липински и коллеги на основе анализа молекул, способных проникать через ГЭБ, сформулировали правило Липински, согласно которому такие молекулы должны иметь молекулярную массу не более 500 кДа, менее 5 Н-связей, менее 10 Н-акцепторов и при этом рассчитанный Log P (коэффициент распределения молекулы) должен составлять менее 5 [174,175]. Соблюдение данных параметров позволяет создавать терапевтические соединения, проникающие через ГЭБ. Кроме того, снизить степень влияния наличия ГЭБ на эффективность проникновения позволяет внутриопухолевое введение препаратов [176].

Интенсивная васкуляризация глиобластомы происходит в результате высокой экспрессии в клетках фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [177]. Эндотелиальные клетки влияют на формирование химиорезистентности СОК за счет секреции фактора стромальных клеток 1, ангиопоэтинов и серпинов, а также вовлеченности сигнальных путей Notch, Shh, ABCB1–ABCG2 (АТФ-связывающие транспортные белки семейства ABC) и других [178]. VEGF также способен поддерживать жизнеспособность СОК [179], а совместное применение ингибиторов VEGF и химиопрепаратов может быть эффективным для терапии глиобластомы [180].

Сосудистая сеть при глиобластоме характеризуется изменениями, которые включают нарушение герметичности межклеточных контактов, изменение диаметра просвета сосудов, а также их гипертрофированные размеры по сравнению с нормальными тканями. Данные факторы препятствуют проведению эффективной противоопухолевой терапии и, в частности, играют решающую роль в устойчивости к химиопрепаратам, а также препятствуют снабжению опухолевой ткани кислородом и питательными веществами, что приводит к гипоксии и ацидозу [181].

Гипоксия, или низкая оксигенация опухоли, играет важную роль в поддержании популяции СОК, устойчивых к терапии. Кроме того, в условиях гипоксии происходит рекрутирование в область новообразования иммунных клеток, которые за счет

проангиогенных свойств способствуют поддержанию и расширению сосудистой сети опухоли [181].

Помимо гипоксии, ацидоз, или состояние повышенной кислотности, также обуславливает развитие химиорезистентности. В нормальных тканях мозга значение pH составляет около 7.1, при этом в онкотрансформированных тканях pH снижается до 6.8, что стимулирует экспрессию VEGF и обеспечивает поддержание фенотипа СОК [182]. Опухолевые клетки для получения энергии преимущественно используют процесс активного гликолиза с последующим образованием лактата («эффект Варбурга»), который, в свою очередь, влияет на прогрессирование опухоли и ее устойчивость к терапии [183].

Механизмы химиорезистентности глиобластомы на молекулярном уровне являются объектом множества исследований. Одним из первых описанных процессов, обуславливающих резистентность к алкилирующим агентам, в частности темозоломиду, является активация фермента репарации ДНК MGMT [9], который, обеспечивая в опухолевой клетке репарацию ДНК, способствует ее дальнейшей успешной репликации. MMR также вносит вклад в химиорезистентность опухоли за счет коррекции несовпадений нуклеотидных оснований. Например, дефицит MSH6 (гомолог 6 белка MutS, осуществляет репарацию (восстановление) после повреждения неспаренных нуклеотидов ДНК), MLH1 (гомолог 1 белка MutL, опосредует белок-белковые взаимодействия в процессе репарации ошибочно спаренных нуклеотидов) и PMS2 (гомолог 2 белка PMS1, эндонуклеаза восстановления несоответствия) ведут к формированию устойчивости к темозоломиду [184–186].

Ещё одним фактором, опосредующим устойчивость глиобластомы к послеоперационной терапии, является гиперактивация сигнальных путей Notch, Wnt, Shh. Известно, что сигнальный путь Notch играет роль в поддержании, самообновлении и дифференцировке стволовых опухолевых клеток, а также является одним из факторов, обуславливающих радиорезистентность глиобластомы за счет активации пути PI3K/Akt1 и повышения уровня белков Bcl-2 (белок В-клеточной лимфомы 2) и Mcl-1 (белок миелоидной лейкемии 1), которые играют важную роль в выживании клеток, ингибируя апоптоз [187]. Путь Wnt играет важную роль в регуляции пролиферативного потенциала СОК глиобластомы, а также индуцирует резистентность к темозоломиду через индукцию экспрессии MGMT, которая защищает геном опухолевых клеток от алкилирующих агентов [188]. Сигнальный путь Shh (Sonic hedgehog) также влияет на самообновление и онкогенность СОК. Shh вносит вклад в резистентность глиобластомы к химиопрепаратам за счет влияния на экспрессию генов трансмембранных белков-транспортёров, которые обуславливают отток лекарственных средств из опухоли [189].

Нарушения регуляции апоптотических процессов в клетках глиобластомы, как и другие механизмы, также могут влиять на эффективность применяемой химиотерапии, радиотерапии и других подходов.

Установлено, что существует два пути апоптоза: митохондриальный (внутренний) и рецептор-опосредованный (внешний). Как внутренний, так и внешний пути апоптоза опосредуются ферментами семейства цистеин-зависимых аспартат-специфических протеаз (каспаз) (Рисунок 7).

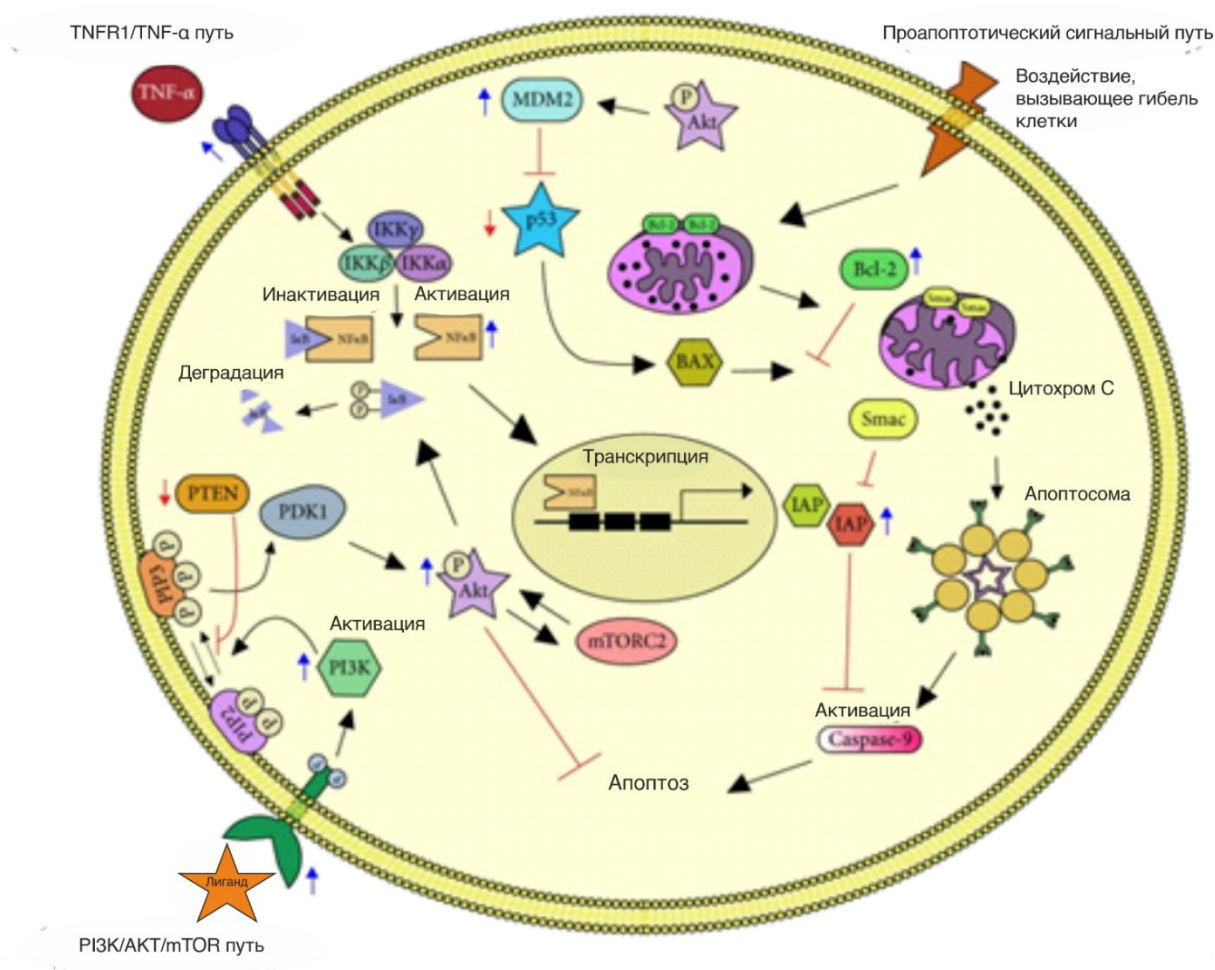


Рисунок 7. Механизмы апоптотической гибели клеток. Адаптировано с [190].

Внутренний путь апоптоза опосредован пермеабиллизацией (изменением проницаемости) внешней мембраны митохондрий, что влечет за собой высвобождение белков межмембранного пространства митохондрий (проапоптотических белков) в цитозоль и запускает каскад апоптотических реакций. К проапоптотическим белкам относятся цитохром C, сериновая протеаза HtrA2 (белок, требуемый при высокой температуре, A2) и Smac (вторичный митохондриальный активатор апоптоза), которые способствуют образованию апоптосомы и активации каспаз, обеспечивающих контролируемую деструкцию клеточных компонентов, что приводит к гибели клетки.

Связывание цитохрома С с АРАФ-1 (активирующий фактор апоптотических протеаз) приводит к формированию апоптосомного комплекса, который активирует ключевую инициаторную каспазу митохондриального пути апоптоза - каспазу-9. Связываясь с прокаспазой-3, каспаза-9 расщепляет ее до эффекторной каспазы-3. Одновременно с этим НtrA2 и Smac могут связываться с XIAP (X-связанный ингибитор апоптоза), инактивируя его и высвобождая каспазу-9 и каспазу-3. Затем активированная каспаза-3 опосредует фрагментацию ДНК за счет инактивации DFFA (альфа-субъединица фактора фрагментации ДНК) и высвобождения бета-субъединицы данного белка (каспаз-активируемой ДНКазы). В результате фрагментации ДНК происходит инициация р53-опосредованной клеточной гибели [191].

При внешнем пути апоптоза связывание родственных лигандов (TNF, CD95L, Аро3L, Аро2L), или агонистических антител, с рецепторами смерти (TNF-R1, FAS (CD95), DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2) на поверхности клетки сразу приводит к активации каспаз. Внешний путь апоптоза связан с формированием DISC (сигнальный комплекс, индуцирующий смерть), который всегда включает Fas-ассоциированный белок с рецептором смерти (FADD) и каспазу-8. При связывании лигандов с TNF-R1 (рецептор 1 фактора некроза опухоли) сначала задействуется домен смерти белка, связанного с TNF-R1 (TRADD), который в свою очередь рекрутирует FADD. TRADD необходим для апоптоза, индуцированного активацией TNF-R1; остальные рецепторы смерти взаимодействуют напрямую с FADD [192].

Активация внешнего апоптотического пути происходит также посредством связывания лигандов с тирозин-киназными рецепторами. Впоследствии активируется PI3K/АКТ1-сигнальный путь [193]. АКТ1-киназа, в свою очередь, фосфорилирует многие нижестоящие мишени, включая IκB, индуцируя активацию NF-κB, mTORC2 и MDM2, что приводит к выживанию клеток.

В опухолевых клетках, в частности в клетках глиобластомы, активированы различные механизмы, нарушающие регуляцию процесса апоптоза. Так, нарушения работы PI3K/АКТ-сигнального пути наблюдается в 70% глиобластом [194]. Активированная киназа АКТ1 индуцирует гиперэкспрессию протоонкогена MDM2, который является негативным регулятором белка р53, опосредуя его деградацию [195].

Активация ядерного фактора-κB (NF-κB) в клетках глиобластомы также ведет к блокировке апоптоза. NF-κB активирует транскрипцию антиапоптотических генов, в частности генов белков ингибиторов апоптоза (IAPs), для подавления индуцируемого TNFα апоптоза в опухолевых клетках [196]. К семейству белков - ингибиторов апоптоза, нейтрализующих каспазы, относят NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, ливин, сурвивин и

BRUCE [197]. В частности, показано, что в клетках глиобластомы высокий уровень белка XIAP, ингибирующего каспазы-3, 7 [198]. Также на эффективность активации апоптоза в опухолевых клетках может влиять уровень белка Smac, который в норме находится в межмембранном пространстве митохондрий. При активации апоптоза по внутреннему пути Smac покидает митохондрии и участвует в связывании белков-ингибиторов каспаз, таких как XIAP [199].

В клетках глиобластомы зачастую регистрируют мутации и потерю функциональности белка PTEN (гомолог фосфатазы и тензина) [200]. PTEN является супрессором опухолей, который модифицирует PIP3 (фосфатидилинозитол (3,4,5)-трифосфат) в PIP2 (фосфатидилинозитол (4,5)-бисфосфат), ингибируя активацию Akt1. Также показано, что транскрипционный фактор STAT3 (сигнальный белок и активатор транскрипции 3) играет важную роль в резистентности СОК глиобластомы к апоптозу. Ингибирование STAT3 снижает экспрессию белков Bcl-XL и сурвивина, индуцируя активацию каспазы-3 и, впоследствии, апоптоз [201].

Недавние исследования демонстрируют, что различные микроРНК также играют важную роль в поддержании резистентности опухолевых клеток к химиотерапии. В частности, показано, что miR-125b опосредует устойчивость к темозоломиду, ингибируя митохондриальный путь апоптоза [202]. С другой стороны, экспрессия некоторых микроРНК в клетках глиом снижена, что также может приводить к снижению эффективности терапии. Например, miR-34a подавляет активность Rictor в комплексе mTORC2, снижая степень фосфорилирования Akt1. Подобная регуляция активности этой киназы приводит к остановке клеточного цикла и активации апоптотических каскадов [203].

### 1.3.3. Резистентность глиом к иммунотерапии

Расширение знаний о том, что центральная нервная система не является иммуно-привилегированным участком [204], наряду с последующими доклиническими исследованиями позволили обосновать применимость иммунотерапии к опухолям головного мозга, в частности глиомам [205,206]. В настоящее время исследователи активно изучают методы лечения глиом, которые включают онколитическую виротерапию, пептидные вакцины, дендритные клетки, CAR-T-клеточную (Т-клетки с химерным антигенным рецептором) терапию и ингибирование контрольных точек иммунитета [207]. Однако результаты исследований данных иммунотерапевтических подходов были в основном отрицательными. Исследования ингибиторов контрольных точек иммунитета в

виде монотерапии или в сочетании со стандартной терапией также не увенчались успехом [208]. Проблемы поиска подходящей иммунной терапии глиом многогранны и в значительной степени связаны с иммуносупрессивным микроокружением опухоли.

Одной из важных причин, обуславливающих иммунологическую «холодность» глиомы, является ее способность оказывать влияние на иммунную систему организма, что зачастую приводит к иммуносупрессивным изменениям. Показано, что клетки глиом способны регулировать представленность молекул МНС класса I на своей поверхности для избегания иммунного надзора [209,210]. При этом клетки микроглии характеризуются потерей молекул МНС класса II [211,212]. Кроме того, опухолевое микроокружение индуцирует образование супрессорных Т-регуляторных клеток за счет продукции IL-6, PD-L1 и IDO-1 (индоламин-пиррол-2,3-диоксигеназа) [213,214]. Клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSC) способны посредством продукции аргиназы, индуцируемой синтазы оксида азота и активных форм кислорода или азота, подавлять иммунный ответ, что приводит к прогрессированию опухоли [215–217]. Опухоль-ассоциированные макрофаги, как было показано двумя научными группами, секретируют иммуносупрессивные цитокины IL10 и TGF $\beta$ , приводящие к индукции СОК [218,219].

Кроме того, клетки глиом характеризуются формированием приобретенной резистентности к иммунотерапии. Показано, что при терапии, включающей блокаду PD-1, у пациентов наблюдается потеря соответствующих неоэпитопов, а также активация генов, ответственных за развитие иммуносупрессии [220], а при использовании анти-EGFRvIII вакцин была зарегистрирована утрата EGFRvIII в 82% случаев [221].

#### 1.3.3.1. Резистентность глиом к виротерапии

Хотя терапия с помощью онколитических вирусов является многообещающим подходом для лечения злокачественных новообразований, в частности глиом, необходимо не только оценивать индивидуальный ответ каждой опухоли на действие вируса, но и исследовать механизмы, которые могут опосредовать чувствительность/устойчивость опухоли к виротерапии. При этом вопрос о механизмах формирования клетками глиом резистентности к онколитическим вирусам остается на сегодняшний день недостаточно изученным.

Наиболее эффективным способом введения онколитических вирусов является внутриопухолевое введение. При непосредственном контакте с опухолевыми клетками терапевтическим вирусам требуется меньше времени для проникновения в клетку, кроме того, большее количество вирусных частиц достигает цели. Для осуществления онколизиса



вирусу необходимо проникнуть в опухолевую клетку, где в дальнейшем происходит его размножение и сборка новых вирусных частиц. Однако формирование противовирусного иммунного ответа может снизить эффективность виротерапии. При этом, существуют работы, где показано, что использование высоких доз вируса для повторных инъекций позволяет избежать влияния вирус-нейтрализующих антител [222].

Одним из результатов иммунотерапии с помощью онколитических вирусов является трансформация иммунологически «холодных» опухолей в «горячие» [223]. С другой стороны, рекрутированные в область локализации опухоли участники противоопухолевого иммунного ответа, осуществляющие цитолиз опухолевых клеток, затрудняют репликацию вирусных частиц, снижая интенсивность инфицирования соседних клеток [224], что может также влиять на эффективность терапии.

На успешность виротерапии может оказывать влияние эффективность проникновения онколитического вируса в клетку. Некоторые онколитические вирусы способны проникать в опухолевые клетки лишь за счет взаимодействия со специфическими рецепторами клетки-хозяина. Аденовирусы, например, связывают рецепторы Коксаки и аденовируса (CAR), интегрины и CD46. Последний рецептор является специфичным и для проникновения вируса кори [225]. Таким образом, необходимо учитывать представленность рецепторов на поверхности опухолевой клетки-мишени при разработке подходов терапии с помощью таких онколитических вирусов.

Однако существуют вирусы, способные проникать в клетку без участия рецепторов, например, вирус болезни Ньюкасла или вирус осповакцины. Вирус осповакцины способен проникать в клетку-хозяина как посредством полного слияния мембран и pH-зависимого эндоцитоза, так и по механизму макропиноцитоза за счет взаимодействия остатков фосфатидилсерина на вирусной мембране с G-белок связывающими рецепторами клетки [226]. Показано, что ингибирование PI3K в клетках приводит к снижению количества проникших в клетку вирионов [227]. Кроме того, на всех стадиях макропиноцитоза задействована p21-активированная киназа RAK1, перемещение которой на плазматическую мембрану приводит к активации множества эффекторов, необходимых для образования макропиносом [226].

Проникновение в клетку вирусных частиц запускает различные сигнальные пути, которые облегчают проникновение других вирусных частиц, а также репликацию вируса в клетке-хозяине. Инфицирование клеток вирусом осповакцины также вызывает скопление липидных рафтов на плазматической мембране клетки, что приводит к колокализации вируса и интегрин  $\beta$ , который участвует в активации PI3K/Akt-сигнального пути для облегчения эндоцитоза [228,229]. Образование филоподий на плазматической мембране

клетки при проникновении вируса герпеса I типа опосредует активацию передачи сигналов Rho-GTPазы [230], которая вовлечена в EGFR и PI3K/Akt-пути.

Таким образом, представленность специфических молекул на поверхности клетки, а также уровень активности различных сигнальных путей, участвующих в процессах проникновения вирусных частиц, может влиять на эффективность инфицирования, а, следовательно, и на эффективность вирусного онколизиса и терапии в целом.

Основное действие онколитических вирусов заключается в прямом лизисе опухолевых клеток. Однако такие вирусы могут быть и причиной активации программируемых каскадов клеточной гибели. Помимо апоптоза, основные программируемые пути клеточной гибели включают ферроптоз, аутофагию, пироптоз и некроптоз [231]. Некроптоз представляет собой регулируемый некроз, в активации которого участвуют белки RIPK1, RIPK3 (взаимодействующая с рецептором серин/треонин-протеинкиназа 1 и 3) и их субстрат MLKL (псевдокиназа доменоподобного белка киназы смешанной линии) [232,233]. Кроме того, в образовании некроптотического комплекса (некроптосомы) участвует каспаза-8, и гибель клетки происходит либо по некроптотическому, либо по апоптотическому пути в зависимости от активности этого фермента [234]. Однако для опухолевых клеток характерно нарушение каскадов программируемой клеточной гибели. Так, показано, что низкие уровни экспрессии генов *RIPK1*, *RIPK3* и *MLKL* связаны с позитивным прогнозом для пациентов с глиомами [235].

Многие из описанных выше онколитических вирусов несут трансгены, продукты которых способны дополнительно усиливать цитотоксический эффект вирусов и противоопухолевый иммунный ответ. Ген *CSF2* человека является одним из наиболее распространенных трансгенов при конструировании рекомбинантных онколитических вирусов. Продукт этого гена, цитокин ГМ-КСФ, используют в иммунотерапии опухолей и как самостоятельный лекарственный препарат в режиме монотерапии, и в составе виротерапии [236]. Однако, по последним данным, ГМ-КСФ – «обоюдоострый» препарат, применение которого может приводить к противоположным результатам (Рисунок 8) [237].

С одной стороны, ГМ-КСФ обладает противоопухолевым действием. ГМ-КСФ стимулирует противоопухолевый иммунный ответ, активируя CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты. Кроме того, ГМ-КСФ стимулирует экспансию дендритных клеток, что значительно повышает уровень противоопухолевого иммунного ответа. Помимо этого, ГМ-КСФ является одним из ключевых регуляторов продукции зрелых нейтрофилов, что в конечном итоге позволяет пациентам избежать нейтропении. С другой стороны, применение ГМ-КСФ может приводить к развитию патогенного эффекта. ГМ-КСФ участвует в регуляции опухолевого микроокружения, активируя такие процессы как эпителиально-

мезенхимальный переход, ангиогенез и синтез checkpoint-ингибиторов (ингибиторов контрольных точек иммунитета). Для клеток рака молочной железы показано, что высокий уровень ГМ-КСФ связан с индукцией секреции CCL18 (хемокиновый лиганд 18) опухоль-ассоциированными макрофагами [238]. CCL18, в свою очередь, усиливает продукцию транскрипционных факторов, запускающих процессы эпителиально-мезенхимального перехода. Как было отмечено выше, ГМ-КСФ участвует в активации нейтрофилов. При этом, данный цитокин может стимулировать продукцию нейтрофилами PD-L1. Такие нейтрофилы подавляют пролиферацию Т-клеток и продукцию IFN- $\gamma$ , что, как показано на модели гастроэнтэральной опухоли, ведет к прогрессии новообразования [239]. Таким образом, резистентность к иммунотерапии онколитическими вирусами, имеющими ГМ-КСФ в качестве трансгена, может быть обусловлена описанными выше феноменами.

Онколитические вирусы могут быть также усилены трансгенами апоптоз-индуцирующих белков. В п.п.1.3.2. подробно описаны механизмы, посредством которых опухолевые клетки формируют резистентность к апоптозу. Данные механизмы могут быть применимы и в отношении устойчивости к виротерапии.

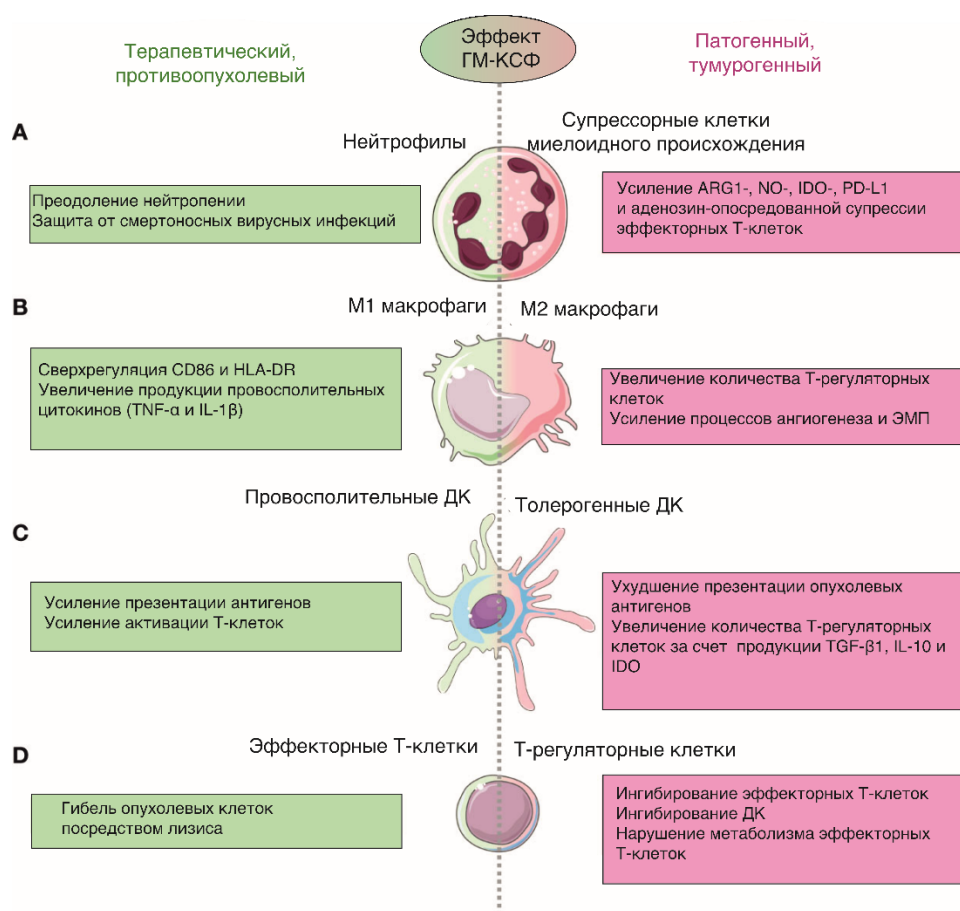


Рисунок 8. Позитивные и негативные последствия терапии с помощью ГМ-КСФ. Адаптировано с [237].

Следует отметить, что и сами онколитические вирусы кодируют белки, ингибирующие гибель клеток, поскольку им необходимо успешно реализовать свой жизненный цикл в клетке-хозяине.

К примеру, белок аденовируса E1B 19K ингибирует апоптоз, образуя гетеродимеры с проапоптотическими белками клетки семейства Bcl-2, что в большей степени стабилизирует митохондриальную мембрану [240,241]. Однако в рекомбинантных онколитических аденовирусах данная область часто deletирована, что увеличивает чувствительность опухолевых клеток к терапии [242]. Поксвирусы кодируют функционально активные серпины, например, *сrmA*, которые, ингибируя каспазы-8 и 1, предотвращают активацию апоптоза, запускаемого «рецепторами смерти» (например, Fas, TRAIL-рецепторами или рецепторами TNF). Кроме того, *сrmA* обладает активностью в отношении гранзима В, что препятствует выведению из организма инфицированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками [243]. Белок вируса осповакцины B1 фосфорилирует p53 опухолевой клетки, опосредуя его деградацию [244]. Белок B12 того же вируса также способен взаимодействовать с p53 и p21, мешая тем самым аресту клеточного цикла и индукции апоптотических каскадов [245,246].

Известно, что вирусы кодируют белки, ингибирующие интерфероновый ответ. Например, РНК VAI аденовируса, белок K3L вируса осповакцины и другие взаимодействуют с интерферон-зависимой протеин-киназой PKR, ограничивая ее способность связываться с целевыми субстратами [247]. Также показано, что белок F1L вируса осповакцины является супрессором белков семейства NLR (Nod-подобные рецепторы), вовлеченных в активацию IL-1 $\beta$ , провоспалительного цитокина, необходимого при ответе клетки на вирусную инфекцию [248,249].

Таким образом, возможные механизмы резистентности глиом к онколитическим вирусам могут определяться как особенностями иммунного ответа организма на вирусную инфекцию, так и уровнем функционирования различных молекулярных путей, которые определяют судьбу инфицированной клетки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данном литературном обзоре рассмотрены особенности глиом и основные стратегии их терапии. На сегодняшний день активно проводятся исследования по молекулярному типированию опухолей, что позволяет выйти на новый уровень персонализированной медицины. Новые подходы к классификации глиальных опухолей также позволяют на основании молекулярно-биологических и прогностических характеристик определять спектр возможных к применению методов лечения.

Виротерапия опухолей является перспективным противоопухолевым подходом. Долгие годы в мире существовало лишь три препарата на основе онколитических вирусов, применяемых в клинике, и одобрение в 2021 году препарата Делитакт (Delytact®) на основе герпесвируса G47Δ для лечения глиобластомы в Японии внушает большие надежды. Кроме того, в настоящее время первый в России препарат на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины проходит 1-ую фазу клинических испытаний в качестве средства для терапии опухолей молочной железы, в том числе с трижды негативным фенотипом. Согласно данным научных исследований VV-GMCSF-Lact фармакологически эффективен и для солидных опухолей других нозологий.

Механизмы формирования резистентности опухолей, в том числе глиом, к существующим и разрабатываемым подходам сложны и многогранны. Таким образом, исследования в данной области актуальны и перспективны. Более того, поиск мишеней, способных усиливать противоопухолевое действие онколитических вирусов, позволит разработать максимально эффективные стратегии терапии, что обеспечит повышение качества жизни и выживаемости пациентов с неутешительным диагнозом глиобластома.

## ГЛАВА 2: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Материалы и оборудование

#### 2.1.1. Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: агароза (AppliChem, США); бромистый этидий (AppliChem, США); глицин (MP Biomedicals, США); трипановый синий 0,4% (Invitrogen, США); Трис (ДИАЭМ, Россия); набор для выделения РНК из клеток животных/бактерий, мазка/соскоба эпителиальных клеток, вирусов на колонках (BiolabMix, Россия); вода, очищенная от РНКаз (DEPC) (BiolabMix, Россия); набор для ОТ-ПЦР в режиме реального времени БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (BiolabMix, Россия); ДНКаз I, свободная от РНКаз (ThermoFisher, США); Nonidet P-40 (NP40) (Helicon, Россия); акриламид (Helicon, Россия); N,N'-метиленабисакриламид (Медиген, Россия); додецил сульфат натрия (SDS) (MP Biomedicals, США); PSA (персульфат аммония) (Sigma-Aldrich, США); IBind Solution Kit (ThermoFisher, США); NuPAGE Transfer Buffer (ThermoFisher, США); TEMED (тетраметилэтилендиамин) (MP Biomedicals, США); Deep Blue Cell Viability Kit (BioLegend, США); Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen, США); Pierce Phosphatase Inhibitors Mini Tablets (ThermoFisher, США); Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics, Германия); Modified Lowry Protein Assay Kit (ThermoFisher, США); Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США); FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США); телазол (Zoetis, США); 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (MTT) (Sigma, США); трис (MP Biomedicals, США); маркер молекулярной массы белков (ThermoFisher, США); этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, США); хлорид натрия (AppliChem, Германия); твин 20 (Хеликон, Россия); обезжиренное сухое молоко для приготовления блокирующего буфера для вестерн-блоттинга (Serva, Германия); набор для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови (Biolabmix, Россия); Биомастер HSqPCR (Biolabmix, Россия); матригель Corning Matrigel Matrix (Corning, США); темозоломид (Sigma-Aldrich, США); прокарбазин (Sigma-Aldrich, США); винкристин (Sigma-Aldrich, США); ломустин (Sigma-Aldrich, США); Омнискан (Amersham Health, Ирландия), натрий-фосфатный буфер (PBS) (Amresco, США), NuPAGE Transfer Buffer (ThermoFisher, США) формалин (Био-Витрум, Россия), парафин HISTOMIX (Био-Витрум, Россия).

Реактивы для культивирования клеток эукариот: GlutaMAX 2 mM (Invitrogen, США); раствор антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицина сульфат,

амфотерицин) (Sigma-Aldrich, Германия); MITO+SERUMEXTENDED (SACCO system, Италия); ростовая среда Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (ThermoFisher, США); ростовая среда Minimum Essential Medium Eagle–Alpha Modification (Alpha-MEM) (ThermoFisher, США); ростовая среда Opti-MEM (Invitrogen, США); ростовая среда Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (ThermoFisher, США); FBS (фетальная бычья сыворотка) (ThermoFisher, США); TrypLE Express (ThermoFisher, США); ростовые добавки N-2 и B-27 (ThermoFisher, США); EGF (эпидермальный фактор роста) и FGF (Фактор роста фибробластов) (Sigma-Aldrich, Германия); StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (ThermoFisher, США); HEPES (Gibco, США).

Антитела: моноклональные антитела мыши к CD15 человека, конъюгированные с флуорохромным красителем Alexa Fluor 647 (R&D SYSTEMS, США); моноклональные антитела крысы к CD44 человека, конъюгированные с флуорохромным красителем Alexa Fluor 488 (R&D SYSTEMS, США); антитела к белку CD133/2 человека, конъюгированные с флуорохромным красителем PE (Miltenyi Biotec, Германия); моноклональные антитела к CD171 человека, конъюгированные с флуорохромным красителем PE (R&D SYSTEMS, США); рекомбинантные моноклональные кроличьи антитела к актину человека (Invitrogen, США); моноклональные кроличьи антитела к pAkt<sup>Ser473</sup> человека (Invitrogen, США); моноклональные мышинные антитела к p85α человека (Invitrogen, США); моноклональные кроличьи антитела к p110α человека (Invitrogen, США); моноклональные кроличьи антитела к pPAK1<sup>Ser198/Ser203</sup> человека (Invitrogen, США); поликлональные кроличьи антитела к pAkt<sup>Thr308</sup> человека (Invitrogen, США); вторичные антитела IgG мыши к IgG кролика, конъюгированные с HRP (R&D Systems, США); вторичные антитела IgG кролика к IgG мыши, конъюгированные с HRP (R&D Systems, США); поликлональные кроличьи антитела к RIPK1 человека (Invitrogen, США); поликлональные кроличьи антитела к RIPK3 человека (Invitrogen, США); поликлональные кроличьи антитела к каспазе-8 человека (Invitrogen, США); поликлональные мышинные антитела к p53 человека (Invitrogen, США); моноклональные кроличьи антитела к каспазе-7 человека (Abcam, Великобритания); поликлональные кроличьи антитела к XIAP человека (Invitrogen, США); моноклональные кроличьи антитела к Smac (DIABLO) человека (Invitrogen, США); поликлональные антитела кролика к гистону H3 человека (Millipore, США); моноклональные антитела кролика к Ki-67 (Roche, Германия); моноклональные антитела кролика к GFAP (Roche, Германия).

### 2.1.2. Оборудование и материалы

Вортекс персональный V-1 plus (BioSan, Латвия); дозаторы автоматические переменного объема Thermo («Ленпипет», Россия); микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия); микроцентрифужные пробирки вместимостью 1.5 и 2 мл (Axugen, США), наконечники с фильтром для автоматических дозаторов объемом 2, 10, 100, 200, 1000 мкл (Axugen, США); штатив для микропробирок (Хеликон, Россия); культуральные флаконы TP25, TP75 (TPP, Швейцария), культуральные планшеты 6-луночные (TPP, Швейцария); культуральные планшеты 96-луночные (TPP, Швейцария); центрифужные пробирки объемом 15 и 50 мл (TPP, Швейцария); мини-ротатор для пробирок BIO RS-24 (Biosan, Латвия); проточный цитофлуориметр BD FACS CantoII (Becton Dickinson, США); автоматический счетчик клеток Countess™ (Invitrogen, США); камеры для подсчета клеток Countess™ (Invitrogen, США); спектрофотометр NanoVue Plus (BioChrom, США); амплификатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США); ПЦР-бокс (BIOSAN, Латвия); программное обеспечение Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad, США); пробирки в стрипах по 8 штук (SSI, Дания); центрифуга Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Германия); спектрофотометр Apollo LB 912 (Berthold Technologies, Германия); Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Англия); камера для электропереноса (Bio-Rad, США); источник тока для электропереноса EPS-301 (GE Healthcare, Англия); набор для вертикального электрофореза Mini PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США); источник тока Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия); лабораторная водяная баня Haake Fisons F3-CN (ThermoFisher, США); нитроцеллюлозная мембрана, 0.45 мкм (Хеликон, Россия); шприцы инсулиновые (Almo Erzeugnisse Erwin Busch GmbH, Германия); инкубатор для клеточных культур (Naraeus HERA cell, Германия); Gel Doc XR System (Bio-Rad, США), Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США); микроскоп AxioStar Plus, оснащенный цифровой камерой AxioCam MRc5 (Zeiss, Германия); Иммуногистостейнер автоматический Roche Ventana BenchMark Ultra (Roche, Германия; Ventana Medical Systems, Inc., США; Cell Marque Corporation, США); вакуумный гистологический процессор HISTO-TEK VP1 (Sakura Seiki Co., Япония); система заливки тканей в парафин Tissue-Tek® TEC™ 5 (Sakura Seiki Co., Япония); микроскопа NICON 50s (Nikon, Япония); диагностический сканер NanoZoomer S360 (Hamamatsu, Япония).



### 2.1.3. Олигодезоксирибонуклеотиды для генспецифичной ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия). Специфичные гибридизационные зонды были синтезированы компанией Синтол (Москва, Россия).

#### **GAPDH**

Forward: 5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'

Reverse: 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC -3'

#### **HPRT**

Forward: 5'- CATCAAAGCACTGAATAGAAAT -3'

Reverse: 5'- TATCTTCCACAATCAAGACATT-3'

#### **SOX-2**

Forward: 5'- GGGAAATGGAGGGGTGCAAAAGAGG -3'

Reverse: 5'-TTGCGTGAGTGTGGATGG GATTGGTG -3'

#### **MYC**

Forward: 5'- CTTCTCTCCGTCCTCGGATTCT -3'

Reverse: 5'- GAAGGTGATCCAGACTCTGACCTT -3'

#### **Lact-FAM**

Forward 5'-TACCATCGGCGGATCACATC-3'

Reversed 5'-AGCACAATACCGGGAGATGG-3'

Probe 5'-FAM- TCAGAAAACCCAAACACTACAACGTCA– BHQ-1 -3'

#### **Rpl30-ROX**

Forward 5'- GATCAGACAAGGCAAAGCGAAG -3'

Reversed 5'- GACCCCAGTTTTAGCCAACATG -3'

Probe 5'- ROX-CTGTCCAGCTTTGAGGAAATC–BHQ2-3'

### 2.1.4. Вирус

Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact любезно предоставлен д.б.н. Кочневой Г.В. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Лекарственное средство на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, субстанция – раствор замороженный представляет собой рекомбинантный вирус осповакцины штамма Л-ИБП, продуцирующий секретируемый гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) человека и несекретируемый

онкотоксический белок лактаптин (штамм VV-GMCSF-Lact), полученный в культуре клеток почки африканской зеленой мартышки 4647.

Для достижения терапевтических доз вируса при внутриопухолевом введении животным в исследования использовали вирусный концентрат с титром вируса  $5 \times 10^8$  БОЕ/мл.

Вирусный концентрат охарактеризован в соответствии с проектом НД на субстанцию Лекарственное средство на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, субстанция раствор замороженный (Приложение А, Таблица А1).

### **2.1.5. Животные**

Самки линии SCID Hairless Outbred SHO-PrkdcscidHrhr Mouse Outbred, возраст 6-8 недель, разведения SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животные содержались в стандартных условиях, на стандартном пищевом и питьевом рационе, согласно действующим нормам. Все эксперименты с лабораторными животными выполнены в соответствии с рекомендациями и требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (Страсбург, 1986). Протоколы одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных Управления Сибирского отделения Российской академии наук (Протокол № 68 от 1 декабря 2020 г).

Самки линии Wistar с массой тела 200-220 грамм разведения филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России. Животные содержались в стандартных условиях, на стандартном пищевом и питьевом рационе, согласно действующим нормам. Все эксперименты с лабораторными животными выполнены в соответствии с рекомендациями и требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (Страсбург, 1986). Протоколы одобрены Комитетом по этике при ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (Протокол №7 от 6 сентября 2022г).

### **2.1.6. Буферы и растворы**

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), pH 7.5;

TBS: 150 mM NaCl, 20 mM Трис, pH 7.5;

TBE: 89 mM Трис, 89 mM борная кислота, 2 mM ЭДТА pH 8.0;

Буфер для цитометрии: 0.5% BSA, 2 mM ЭДТА в PBS;

RIPA: 1% NP40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 50 mM Трис, 1 таблетка PIC (на 50 мл RIPA буфера), pH 7.4;

PBST: 1% Tween 20 в PBS;

TBST: 1% Tween 20 в TBS;

Буфер для электрофореза: 25 mM Трис, 250 mM глицин, 1% SDS, pH 8.2-8.8;

Блокирующий буфер: 5% BSA, 2 mM ЭДТА в PBS;

Блокирующий раствор: 5% сухое обезжиренное молоко в PBST/TBST;

ПААГ (полиакриламидный гель) концентрирующий: 125 mM Трис-HCl, 5% акриламид, 0,1% N,N'-метиленбисакриламид, 0.1% SDS, 0.03% TEMED, 0.1% PSA, pH 6.8;

ПААГ разделяющий: 0.3 M Трис-HCl, 10% акриламид, 0.2% N,N'-метиленбисакриламид, 0.1% SDS, 0.06% TEMED, 0.1 % PSA, pH 8.8;

Буфер для нанесения: 50 mM Трис-HCl, 100 mM β-меркаптоэтанол, 1% SDS, 10% глицерин, 75 нг/мл бромфеноловый синий, 75 нг/мл ксиленианол, pH 6.8;

1%-ый агарозный гель: 1% агароза, 0.5 мкг/мл этидиум бромид, TBE.

### **2.1.7. Культуры клеток эукариот**

В работе использовали иммортализованные культуры клеток глиобластомы человека U87 MG, U343 MG (Коллекция клеточных культур ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск); полученные ранее из образцов опухолей культуры клеток глиом человека MG1, MG2, MG4, AS1 и AS2 (получены н.с. Нуштаевой А.А., м.н.с. Войтовой А.А., лаборантом Дмитриевой М.Д., лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск); клетки глиомы С6 крысы (Коллекция клеточных культур ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). Культуры BR1.20, BR2.20, BR3.20, BR4.21 и BR5.21 получены из образцов опухолей пациентов в рамках выполнения данной работы.

## **2.2. Методы**

### **2.2.1. Получение культур клеток глиом из образцов опухолей пациентов**

Образцы ткани опухолей получены с информированного согласия пациентов Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна (Новосибирск, Россия). Исследование одобрено Комитетом по этике Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна (протокол № 050/17 68 от 11.09.2017).

Образцы глиомы (BR1, BR2, BR3, BR4 и BR5) механически диссоциировали в среде IMDM с помощью скальпеля, промывали 10х избытком фосфатно-солевого буфера (PBS) и собирали центрифугированием при 300×g. Для адгезии клеток образцы помещали в 6-луночные планшеты в среду IMDM с 10% FBS, 2 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 250 мкг/мл амфотерицина В и культивировали при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Культуральную среду меняли каждые 3 или 4 дня до тех пор, пока клетки не достигнут конfluence 70-80%. При достижении 70–80% конfluence клетки собирали с использованием Triple-Express и субкультивировали для дальнейших экспериментов не более 15 пассажей. Для формирования криобанка полученные культуры клеток замораживали в количестве 3×10<sup>6</sup> клеток/ампула в криосреде (18.5% IMDM, 74.4% FBS, 7% DMSO).

### **2.2.2. Культивирование клеток иммortalизованных линий глиом человека и глиомы С6 крысы**

Клетки линий U87 MG и U343 MG культивировали в среде MEM α с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 250 мкг/мл амфотерицина В при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Клетки глиомы С6 крысы культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 250 мкг/мл амфотерицина В при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.2.3. Культивирование клеток глиом человека в адгерентных условиях и в условиях формирования нейросфер**

Клетки культур глиом человека, полученные из образцов опухолей, в адгерентном состоянии культивировали в среде IMDM с добавлением 10% FBS, 4 mM L-глутамина (GlutaMAX) и раствора антибиотика-антимикотика (100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 250 мкг/мл амфотерицина В) и 1/1000 от объема MITO+SERUM EXTENDED в культуральных флаконах TP25. По достижению монослоя клетки открепляли 400 мкл TrypLE в течение 4 минут при 37°C, добавляли 1 мл ростовой среды IMDM и рассевали в соотношении 1:3 по объему.

Для формирования нейросфер клетки культур глиом человека, полученные из образцов опухолей, высевали в 6-луночные планшеты в количестве 3×10<sup>5</sup> клеток на лунку.

Добавляли по 3 мл среды для культивирования нейросфер: DMEM/F12 с добавлением 10 mM HEPES, 4 mM GlutaMAX и раствора антибиотика-антимикотика (100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 250 мкг/мл амфотерицина В), 1xN-2, 1xB-27, 40 нг/мл EGF и 20 нг/мл FGF.

Каждые 1-2 дня добавляли по 1.5 мл свежей среды, не убирая старую. Клетки пассировали, когда центр нейросферы уплотнялся, либо клетки достигали слишком высокой плотности (на 4-8 день культивирования).

Для пассирования клетки вместе со средой переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл и центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин (центрифуга Eppendorf 5424R). Супернатант отбирали, оставляя около 200 мкл, затем осадок клеток ресуспендировали в 5 мл PBS и центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин (центрифуга Eppendorf 5424R). Супернатант аккуратно удаляли, к осадку клеток добавляли 0,5 мл аккутазы на 4 мин при 37°C и аккуратно пипетировали 20 - 30 раз. Добавляли 1 мл свежей ростовой среды для нейросфер и центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин (центрифуга Eppendorf 5424R). Супернатант убирали и ресуспендировали клетки в 1 мл свежей ростовой среды для нейросфер.

Далее производили подсчет клеток, и клетки рассевали на 6-луночный планшет в количестве  $3 \times 10^5$  клеток на лунку для последующего культивирования.

### **2.3.4. Проточная цитометрия**

Клетки помещали в микроцентрифужные пробирки в количестве  $5 \times 10^5$  клеток в 200 мкл PBS. Центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин (центрифуга Eppendorf 5424R) при +4°C, отбирали супернатант, и к осадку клеток добавляли по 100 мкл блокирующего буфера (5% BSA, 2 mM ЭДТА в PBS). Затем клетки дважды промывали PBS и добавляли по 100 мкл соответствующих антител (1:100) в буфере для цитометрии. В неокрашенный контроль добавляли 100 мкл буфера для цитометрии. Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при +4°C. Далее клетки дважды промывали PBS, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок клеток в 500 мкл PBS. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II.

### **2.3.5. Вестерн-блот**

#### **2.3.5.1. Подготовка лизатов клеток глиом**

Исследуемые образцы клеток промывали фосфатно-солевым буфером PBS с последующим лизисом в буфере RIPA (1% NP40, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 50 mM Трис-HCl,

1 таблетка PIC, pH 7,4) в присутствии ингибиторов протеаз и фосфатаз: Pierce Phosphatase Inhibitors Mini Tablets, Protease Inhibitor Cocktail Tablets.

Клетки инкубировали в течение 30 минут на льду, затем клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000 g, +4°C и супернатант переносили в чистые пробирки. Концентрацию белка в полученных лизатах определяли с использованием коммерческого набора Modified Lowry Protein Assay Kit, согласно протоколу производителя (ThermoFisher, США).

#### **2.3.5.2. Электрофорез**

Электрофоретическое разделение белков проводили в денатурирующем ПААГ (10% - 15%, в зависимости от массы исследуемых белков) с использованием камеры для вертикального электрофореза. Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану.

#### **2.3.5.3. Электротransfer**

Мокрый перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм) осуществляли в буфере для переноса NuPAGE Transfer Buffer при постоянном токе 400 мА в течение 1 часа. 1x NuPAGE Transfer Buffer готовили с использованием очищенной воды и метанола, согласно инструкции производителя.

#### **2.3.5.4. Детекция целевых белков**

Нитроцеллюлозную мембрану переносили в камеру с подготовленным блокирующим раствором. После 20 минут инкубации при комнатной температуре проводили трехкратную промывку PBST/TBST (для фосфорилированных белков). Затем в камеру добавляли 10 мл раствора соответствующих первичных антител (1:5000). Инкубацию мембраны проводили в течение 12-18 часов при +4°C на ротаторе. Затем мембрану трижды промывали PBST/TBST. Далее вносили раствор вторичных антител IgG мыши, конъюгированных с HRP (1:10000), или вторичных антител IgG кролика, конъюгированных с HRP (1:10000), в зависимости от того, от какого иммунизированного животного были получены первичные антитела. Инкубацию проводили в течение 2.5 часов при комнатной температуре или 12 часов при +4°C.

После промывки мембраны PBST производили детекцию белков с использованием набора реагентов Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit и системы для

хемилюминесцентной детекции Amersham™ Imager 600. Для нормировки мембраны окрашивали рекомбинантными моноклональными кроличьими антителами к  $\beta$ -актину. Результаты Вестерн блоттинга анализировали с помощью программы GelAnalyzer 2010a (lazarsoftware.com).

#### **2.3.5.5. Ко-иммунопреципитация**

Готовили лизаты клеток соответственно **пункту 2.3.5.1.** Ко-иммунопреципитацию проводили с использованием агарозных частиц Protein A/G PLUS-Agarose и соответствующих антител. Суспензию лизата (500 мкг в 1 мл RIPA) с агарозными частицами (20 мкл, исходная концентрация: 250 мкл агарозы в 1 мл PBS) и первичными антителами (1.5 мкг) инкубировали в течение 18 часов при +4°C. Затем образцы центрифугировали при +4°C в течение 5 минут при 1000 g. Далее осадок трижды промывали холодным RIPA буфером. После центрифугирования при +4°C в течение 5 минут при 1000 g осадок ресуспендировали в 40 мкл 1x буфера для нанесения.

Полученные иммунопреципитаты использовали для дальнейшего Вестерн-блот анализа, как описано в пунктах 2.3.5.1-2.3.5.4.

### **2.3.6. Оценка уровня экспрессии генов *SOX-2* и *MYC* в клетках культур глиом человека**

#### **2.3.6.1. Выделение РНК**

Выделение РНК клеток исследуемых культур проводили с помощью набора для выделения РНК из клеток животных/бактерий, мазка/соскоба эпителиальных клеток, вирусов на колонках (BiolabMix, Россия) в соответствии с протоколом производителя. После выделения измеряли концентрацию полученной РНК на спектрофотометре NanoVue Plus при длине волны 260 нм. Качество и количество РНК оценивали по оптической плотности при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм и по результатам электрофореза в 1% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией с помощью системы Gel Doc XR System (Bio-Rad).

#### **2.3.6.2. Обработка ДНКазой**

Очистку выделенной РНК от ДНК проводили с помощью набора ДНКазы I, свободная от РНКаз (ThermoFisher, США) в соответствии с протоколом производителя.

После обработки измеряли концентрацию РНК на спектрофотометре NanoVue Plus при длине волны 260 нм.

### 2.3.6.3. ОТ-ПЦР в режиме реального времени

С помощью программного обеспечения «Bio-Rad CFX Manager 3.1» программировали амплификатор Bio-Rad CFX96 с системой детекции в режиме «реального времени».

Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Реакционная смесь содержала 20 нг образца РНК, 30 нмоль каждого праймера, 12.5 мкл 2х смеси БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue, 1 мкл 25х смеси ферментов БиоМастер-Микс (содержит HS-Taq-полимеразу, инактивированную специфическими моноклональными антителами, и обратную транскриптазу M-MuLV –RH) и воду, очищенную от РНКаз (DEPC).

Для проведения реакции использовали амплификатор Real-Time CFX96 с заданной программой:

1. Для амплификации участков *SOX-2* и *MYC*: обратная транскрипция 45°C – 10 мин, 95°C – 5 мин; 45 циклов: денатурация 95°C – 5 сек, отжиг 56°C – 15 сек, элонгация 72°C – 10 сек; 81°C – 5 сек; 83°C – 5 сек.
2. Для амплификации участков *HPRT* и *GAPDH* (референсные гены): обратная транскрипция 45°C – 10 мин, 95°C – 5 мин; 45 циклов: денатурация 95°C – 5 сек, отжиг 60°C – 10 сек, элонгация 82°C – 10 сек; 81°C – 5 сек; 83°C – 5 сек.

Обработку данных ОТ-ПЦР проводили с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro.

### 2.3.7. Оценка цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом человека и крысы

Клетки immortalized линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов, достигшие 60% конфлюэнтности в течение 24-36 часов на 96-луночном планшете, инкубировали с VV-GMCSF-Lact в 100 мкл среды Opti-MEM без фенолового-красного в течение 72 ч при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. При этом множественность инфекции вируса составляла от 0.0012 БОЕ до 10 БОЕ на клетку. Контрольные клетки инкубировали в тех же условиях без добавления вирусного препарата. После окончания инкубации в лунки добавляли по 10 мкл реагента из набора Deep Blue Viability Kit и инкубировали в течение 4 - 8 часов при 37°C. Резазурин, входящий в состав



реагента, при восстановлении в метаболически активных (живых) клетках превращается в розовый флуоресцирующий резорурфин. Оптическую плотность раствора оценивали с помощью колориметрического метода обнаружения на спектрофотометре Apollo LB 912 (фоновое поглощение при 620 нм вычитали из поглощения резорурфина при 590 нм).

Жизнеспособность клеток определяли относительно жизнеспособности контрольных клеток (100%)  $\pm$  SD по результатам трех независимых экспериментов.

### **2.3.8. Оценка цитотоксической активности химиопрепаратов в отношении клеток глиом человека**

Для оценки цитотоксической активности химиопрепаратов в отношении клеток глиом человека готовили стоковые растворы исследуемых агентов в соответствующих растворителях: 150 мМ темозоломида в ДМСО, 40 мМ ломустина в этаноле (96%), 2 мМ винкристина и 225 мМ прокарбазина в стерильной воде. Диапазон исследуемых концентраций темозоломида составлял 11.25 - 840 мкМ, ломустина - 5 - 200 нМ, винкристина – 0.05 - 200 мкМ и прокарбазина – 405 мкМ – 4.5 мМ. В экспериментах с темозоломидом и ломустином максимальная концентрация ДМСО и этанола составила не более 0.5% и 1.4%, соответственно. Цитотоксичность максимальных концентраций ДМСО и этанола в отношении клеток исследуемых культур оценивали в отдельном эксперименте.

Клетки, достигшие 60% конфлюэнтности, обрабатывали препаратами и инкубировали в течение 72 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием коммерческого набора Deep Blue Viability Kit, как описано в пункте 2.3.7.

### **2.3.9. Оценка комбинированного действия темозоломида и VV-GMCSF-Lact**

При исследовании комбинированного действия темозоломида и VV-GMCSF-Lact по схеме вирус-темозоломид клетки, достигшие 60% конфлюэнтности, обрабатывали вирусным препаратом в дозе равной CD50 (концентрации препарата, при которой погибает 50% клеток) для каждой культуры клеток. Затем через 12, 24, 36, 48 или 60 часов инкубации с вирусом к клеткам добавляли темозоломид. Концентрации темозоломида выбирали исходя из CD50 темозоломида для каждой культуры (CD50, меньше CD50 и больше CD50).

При исследовании комбинированного действия темозоломида и VV-GMCSF-Lact по схеме темозоломид-вирус, клетки сначала обрабатывали темозоломидом, затем через 24 часа добавляли вирусный препарат. Концентрации темозоломида выбирали исходя из CD50 темозоломида для каждой культуры (CD50, меньше CD50 и больше CD50).

Общее время инкубации клеток с препаратами составляло 72 часа при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием коммерческого набора Deep Blue Viability Kit, как описано в пункте 2.3.7.

Комбинационные индексы вычисляли с помощью программного обеспечения CompuSyn (ComboSyn, США). В качестве характеристики антогонистического эффекта рассматривали индексы меньше 1, аддитивного эффекта – равные 1, синергического эффекта – больше 1.

### **2.3.10. Оценка биораспределения VV-GMCSF-Lact в организме мышей линии SCID**

Клетки U87 MG ( $5 \times 10^5$  клеток) интракраниально трансплантировали мышам линии SCID. При достижении размера опухоли по данным МРТ-сканирования 4 мм<sup>3</sup> мышам внутривенно вводили VV-GMCSF-Lact в дозе  $5 \times 10^7$  БОЕ/мышь, 2 инъекции с интервалом 7 дней. Через 7 дней после последнего введения препарата мышей подвергали эвтаназии и брали образцы крови, опухоли и органов (головной мозг, легкие, почки, печень) для дальнейшего выделения ДНК. Количество VV-GMCSF-Lact в биологических образцах оценивали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени.

Для оценки количества вирусных геномов рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact в крови и органах мышей проводили выделение ДНК из образцов исследуемого материала и одновременную амплификации участков ДНК рекомбинантного вируса осповакцины и ДНК гена *Rpl30* мыши. ДНК мышинового гена *Rpl30* использовали в качестве эндогенного внутреннего контроля. Для проведения реакции амплификации в мультиплексном формате использовали два набора праймеров: праймеры Lact-FAM, нацеленные на ген лактапина и фланк-область вируса (область генома вируса, фланкирующая с 3'-конца встроенный ген лактапина), и Rpl30-ROX, нацеленный на фрагмент гена *Rpl30* мыши.

#### **2.3.10.1. Выделение ДНК**

Выделение ДНК из крови и тканей проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови (Биолабмикс, Новосибирск, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

### 2.3.10.2. ПЦР в режиме реального времени

Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Реакционная смесь содержала 10 мкл образца ДНК, 30 нмоль каждого праймера, 12.5 мкл 2х смеси BioMaster HS-qPCR и стерильную воду.

Детектирование флуоресцентного сигнала осуществляли непосредственно в ходе ПЦР с помощью усилителя с системой детектирования флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» CFX96 (BioRad, США).

Программа амплификации: предварительная денатурация 95°C – 5 мин; 45 циклов: денатурация 95°C – 5 сек; отжиг-элонгация 60°C – 40 сек.

Для количественного ПЦР-анализа готовили стандартные образцы с известной концентрацией ДНК-мишени в буфере для элюции из набора для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови (Биолабмикс, Новосибирск, Россия). Количество вирусных геномов определяли с помощью автоматически построенной стандартной кривой и программного обеспечения BioRad CFX Manager (BioRad, США).

### 2.3.11. Исследование противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиом человека *in vivo*

Клетки U343 MG, U87 MG ( $3 \times 10^6$  клеток на мышь, в PBS) и MG1ns, MG4ns ( $5 \times 10^6$  клеток на мышь, в PBS) смешивали с матригелем (BD Bioscience) в соотношении 1:1 в объеме 100 мкл и трансплантировали мышам SCID подкожно. Размеры сформировавшихся опухолей измеряли штангенциркулем и рассчитывали объемы опухолей ( $V_t$ ) по формуле 1:

$$V_t = (a^2 \times b)/2, \quad (1)$$

где  $a$  – меньший диаметр опухоли в мм и  $b$  – больший диаметр опухоли в мм.

При достижении опухолью размера 100 - 120 мм<sup>3</sup> мышам-опухоленосителям внутриопухолево вводили VV-GMCSF-Lact в дозе  $10^7$  БОЕ/мышь, 3 - 4 инъекции с интервалом 7 дней. Животные контрольной группы получали физиологический раствор по той же схеме.

Для оценки антиметастатической эффективности VV-GMCSF-Lact клетки U343 MG ( $3 \times 10^6$  клеток на мышь, в PBS) трансплантировали подкожно на разные стороны тела мышей SCID для образования «опухоли» и «метастаза». Вирус вводили только в «опухоль» по описанной выше схеме.

Торможение роста опухоли (ТРО) во всех экспериментах *in vivo* рассчитывали по формуле 2:

$$\text{ТРО (\%)} = 1 - (V_t/V_c) \times 100 (\%), \quad (2)$$

где  $V_t$  — средний объем опухоли мышей опытной группы и  $V_c$  — средний объем опухоли контрольных животных. Для анализа различий объемов опухолей между группами использовали U-критерий Манна-Уитни.

### 2.3.12. Противоопухолевая эффективность комбинации VV-GMCSF-Lact и ТМЗ в отношении глиобластомы U87 MG

Клетки U87 MG ( $3 \times 10^6$  клеток на мышь, в PBS) трансплантировали подкожно мышам SCID. Объемы опухолей ( $V_t$ ) измеряли и рассчитывали с использованием формулы 1. При достижении размера опухоли размера 100–120 мм<sup>3</sup> мышам-опухоленосителям вводили препараты согласно Таблице 2.

Таблица 2. Схема терапии мышей с подкожно трансплантированными опухолями U87 MG с помощью VV-GMCSF-Lact и ТМЗ как в режиме монотерапии, так и в комбинации.

Группа (n=6)	Терапевтическая схема
VV-GMCSF-Lact	<b>Вирусный препарат:</b> в/о введение, доза $10^7$ БОЕ/мышь, 3 инъекции с интервалом в 7 дней
ТМЗ	<b>ТМЗ:</b> в/б введение, доза 7,5 мг/кг, 4 инъекции, ежедневно
VV-GMCSF-Lact+ТМЗ	<b>Вирусный препарат:</b> в/о введение, доза $10^7$ БОЕ/мышь, один раз. <b>ТМЗ:</b> через 8 дней после вируса, в/б введение, доза 7,5 мг/кг, 4 инъекции, ежедневно.
Группа (n=6)	Терапевтическая схема
ТМЗ+VV-GMCSF-Lact	<b>ТМЗ:</b> в/б введение, доза 7,5 мг/кг, 4 инъекции, ежедневно. <b>Вирусный препарат:</b> через 72 ч после ТМЗ, в/о введение, доза $10^7$ БОЕ/мышь, 3 инъекции с интервалом в 7 дней
Контроль	Нелеченные мыши-опухоленосители

Для проведения гистологического анализа образцы опухолей фиксировали в 10% забуференном формалине (Био-Витрум, Россия) и проводили дегидратацию в восходящих этанолах и ксилолах и заключали в парафин HISTOMIX (Био-Витрум, Россия). Парафиновые срезы (5 мкм) нарезали на микротоме Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США) и окрашивали гематоксилином и эозином. Все изображения оценивали и

сканировали с использованием микроскопа Axiostar Plus, оснащенного цифровой камерой Axiocam MRc5 (Zeiss, Германия) при увеличениях  $\times 100$ ,  $\times 200$  и  $\times 400$ .

Митотическую активность в опухолевой ткани анализировали путем расчета числовой плотности (Nv) митозов на единицу тестовой площади. Степень деструктивных изменений опухолевого узла оценивали путем подсчета площади среза, занимаемой опухолевой тканью в состоянии некротического распада, в том числе инфильтрированной гранулоцитами, по отношению ко всей площади среза опухолевого узла. При морфометрическом исследовании оценивали от 5 до 15 полей зрения в зависимости от состояния опухолевого узла и степени его поражения.

### **2.3.13. Ортотопическая трансплантация глиомы С6 крысам линии Wistar**

Для ортотопической трансплантации клеток глиомы С6 использовали самок крыс линии Wistar с массой тела 200-220 грамм. Клетки глиомы С6 трансплантировали в область стриатума (по координатам Ap -1, L 3.0, V 4.5) в количестве 500 тысяч клеток на животное. Перед началом оперативного вмешательства животным внутрибрюшинно вводили водный раствор кетамина в дозе 0,2 - 0,4 мл. После наступления стадии наркоза очищали от шерсти кожу головы и фиксировали животное на стереотаксическом столике (Leica Biosystems, USA). Кожу головы дезинфицировали 70% этанолом и проводили разрез мягких тканей головы вдоль сагиттального шва в промежутке между лобно-теменным и теменно-затылочным швами с помощью скальпеля. Кожу раздвигали и фиксировали с помощью хирургического расширителя, после чего скелетировали кость. Манипулятор стереотаксической системы настраивали на координаты Ap: -1, L: 3.0 для определения точки, в которой впоследствии с помощью зубного бура делали трепанационное отверстие. Через данное отверстие с использованием шприца Гамильтон (Hamilton Company), соединенного с манипулятором и инфузоматом, вводили клеточную суспензию со скоростью 3 мкл/мин, предварительно установив иглу в координате V: 4.5 стереотаксической системы координат. По окончании введения клеточной суспензии оставляли иглу в отверстии на 5 минут. Затем иглу аккуратно вынимали, мягкие ткани ушивали узловыми швами и обрабатывали поверхность раны. Развитие опухолей контролировали с помощью МРТ-сканирования на МР-томографе Clin Scan (Bruker Biospin, USA).

### 2.3.14. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы C6 *in vivo*

Двадцать одну крысу линии Wistar с ортотопически трансплантированными опухолями C6 разделили на три группы: по 9 животных в группах внутриопухолевого и внутривенного введения и 4 крысы в контрольной группе, как показано в Таблице 3.

Таблица 3. Схема эксперимента по оценке противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы C6 *in vivo*

Группа	Способ введения	Количество животных	Доза VV-GMCSF-Lact	Схема терапии
А	Внутриопухолевое (в/о)	9	$1,65 \times 10^7$ БОЕ	3 инъекции каждые 7 дней
Б	Внутривенное (в/в)	9	$3 \times 10^8$ БОЕ	3 инъекции каждые 7 дней
В	Контроль	2	Физ. раствор внутривенно	3 инъекции каждые 7 дней
		2	Физ. раствор внутриопухолево	3 инъекции каждые 7 дней

Все инъекции проводили на животных, находящихся под наркозом с использованием Телазола в дозе 15 мг/кг.

Внутриопухолевое введение осуществляли с помощью стереотаксической системы по индивидуальным для каждого животного координатам, определенным на 6-е сутки после трансплантации опухолевых клеток по МРТ-изображениям. VV-GMCSF-Lact вводили в дозе  $1,65 \times 10^7$  БОЕ/50 мкл. При внутривенном введении препарат вводили животным через нижнюю полую вену в дозе  $3 \times 10^8$  БОЕ/мл. Животные контрольной группы не получали никаких инъекций.

На 13-й, 20-й, 26-й день после трансплантации опухолевых клеток (на 6-й день после каждого введения препарата) выполняли МРТ-сканирование опухолей в режимах T2 и T1 с контрастным усилением с использованием гадолиний содержащего контрастного вещества Омнискан (GE Healthcare, США).

Для оценки противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact оценивали динамику изменения объема опухоли и выживаемость животных.

Объемы опухоли рассчитывали с использованием программы обработки и анализа изображений ImageJ (National Institutes of Health, США). Торможение роста опухоли рассчитывали по формуле 2.

Количественный анализ ДВ-MPT (диффузионно-взвешенная MPT) осуществляли с помощью измеряемого коэффициента диффузии (ИКД) в мм<sup>2</sup>/с по формуле 3:

$$\text{ИКД} = -(\ln(Sb/S0))/b \quad (3)$$

где  $Sb$  — интенсивность сигнала при каждом значении  $b$  фактора,  $S0$  — интенсивность сигнала без градиента диффузии.

Скорость роста (TGR) опухоли рассчитывали на основании данных T2-взвешенной MPT по формуле 4:

$$\text{TGR} = \lg(\Delta V_0) / \Delta t \quad (4)$$

где  $\Delta V_0$  — изменение объема опухоли по сравнению с  $\Delta t$  с 6 по 26-е сутки.

Для оценки выживаемости крыс при лечении VV-GMCSF-Lact использовали процедуру Каплана-Майера. Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения XLSTAT (Lumivero, США).

Для иммуногистохимического анализа фрагменты головного мозга фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, подвергали проводке в тканевом гистопроцессоре Histo-Tek VP1 и заливали в парафиновую среду «Гистомикс» с использованием модульной системы заливки парафином Tissue Tek ®Тес 5. Иммуногистохимическое исследование осуществляли на срезах толщиной 3-4 мкм с использованием полимерно-протеиново-пероксидазного метода по стандартной методике с использованием системы визуализации и концентратов антител для автоматических анализаторов Ventana BenchMark Ultra. В качестве первичных антител использовали моноклональные кроличьи антитела против анти-Ki-67 (30-9) и GFAP – (EP 672Y) (Ventana). Рабочие растворы в разведении 1:100 готовили из лиофилизированных концентратов, предварительно разведенных в 100 мкл AntiBody Diluent (Ventana). После депарафинизации и обезвоживания срезы обрабатывали 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 20 мин для блокирования эндогенной пероксидазы, затем промывали дистиллированной водой и инкубировали в буферном растворе (Ventana) в течение 30 мин при  $t = 98$  °C для демаскировки антигенных детерминант. После отмывания буферным раствором (3 раза по 5 мин) на срезы наносили рабочие разведения концентратов первичных антител и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации с первичными антителами срезы промывали (3 раза по 5 мин) в отмывочном буферном растворе, предварительно приготовленном из концентрата, затем наносили систему детекции полимерно-протеинового-пероксидазного комплекса и инкубировали в

течение 30 мин при комнатной температуре. Выявление антигенных эпитопов осуществляли с помощью DAB (Ventana).

Для проведения микроскопического исследования с последующим сканированием гистологических препаратов использовали аппаратно-программный комплекс Nis-Elements AR 4.12.00 на базе исследовательского микроскопа NICON 50s с цифровым сканером HAMAMATSU NanoZoomer S360.

### **2.3.15. Оценка апоптотических процессов в клетках глиом под действием VV-GMCSF-Lact**

В лунки 12-луночных планшетов, содержащих  $2 \times 10^5$  клеток/лунку, добавляли VV-GMCSF-Lact с множественностью инфекции 1 БОЕ на клетку. Клетки с вирусом инкубировали при 37°C 24 ч и анализировали методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACSCantoII. Апоптотические клетки идентифицировали с использованием коммерческого набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences, США).

### **2.3.16. Статистика**

Для статистического анализа данных, полученных в экспериментах *in vitro*, использовали t-критерий Стьюдента. Для анализа различий объемов опухолей между группами в экспериментах *in vivo* использовали U-критерий Манна-Уитни. Все планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение от среднего. Предположения о линейной связи между переменными (корреляцию) рассчитывали с помощью коэффициента детерминации ( $R^2$ ). Различия между группами считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

Для статистической обработки данных использовали расширение XLStat для программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft, США).



### ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Применение онколитических вирусов является одним из перспективных направлений в разработке противоопухолевых лекарственных средств. Разработанный в ИХБФМ СО РАН совместно с ГНЦ ВБ Вектор рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact успешно прошел доклинические испытания и находится на первой стадии клинических испытаний в качестве средства для терапии рака молочной железы человека.

В доклинических исследованиях было показано, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток человека различного гистогенеза, в том числе в отношении клеток линии U87 MG глиобластомы человека. Для оценки противоопухолевого потенциала VV-GMCSF-Lact в отношении злокачественных новообразований головного мозга необходимы дальнейшие исследования его фармакологической эффективности с использованием различных моделей глиом, а также изучение механизмов, обуславливающих эффективность цитотоксического действия вируса.

#### **3.1. Получение и характеристика культур клеток глиом, полученных из образцов опухолей пациентов, как модели для оценки цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact**

##### **3.1.1. Получение культур клеток глиом из образцов опухолей различной степени злокачественности**

В доклинических исследованиях противоопухолевых препаратов используют различные модели, позволяющие оценить цитотоксическое действие исследуемого агента *in vitro* и его противоопухолевую эффективность *in vivo*. Для оценки противоопухолевой эффективности лекарственных средств, ориентированных на лечение солидных опухолей, к которым относятся глиомы, обязательным условием является подбор культур клеток опухолей человека, адаптированных к росту *in vivo* и дающих подкожные ксенографты при трансплантации иммунодефицитным животным [250]. Значительная часть доклинических исследований проведена с использованием иммортализованных линий клеток. Данные модели хорошо охарактеризованы и удобны в использовании. Однако клетки иммортализованных линий при длительном культивировании подвергаются дифференцировке и не отражают внутриопухолевую гетерогенность, свойственную злокачественным новообразованиям, в том числе глиомам [251]. Одним из более

релевантных подходов, применяемых при исследовании свойств опухолей и действия противоопухолевых препаратов, являются культуры клеток, полученные из образцов опухолей пациентов [252].

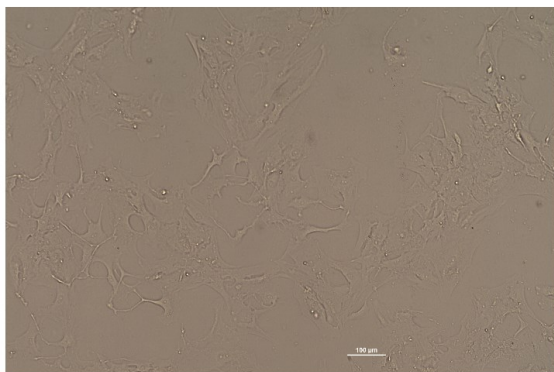
Для оценки цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact была создана коллекция культур клеток глиом, полученных из образцов опухолей пациентов (Рисунок 6). Для получения данных культур были использованы образцы глиом различной степени злокачественности, предоставленные Новосибирским научно-исследовательским институтом травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна с письменного согласия пациентов. Образцы опухолей подвергали механической и ферментативной диссоциации. Культуры были получены как описано в **пункте 2.2.1**. Работы по получению культур клеток глиом из образцов опухолей пациентов выполнены совместно с к.б.н., н.с. лаборатории биотехнологии Нуштаевой А.А. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).

В условиях культивирования в ростовой среде, содержащей сыворотку, и с использованием культурального пластика, обработанного для улучшения адгезии, клетки формируют монослой и имеют типичную для глиом веретенообразную и звездчатую морфологию (Рисунок 9). Полученные культуры были обозначены как BR1.20, BR2.20, BR3.20, BR4.21 и BR5.21.

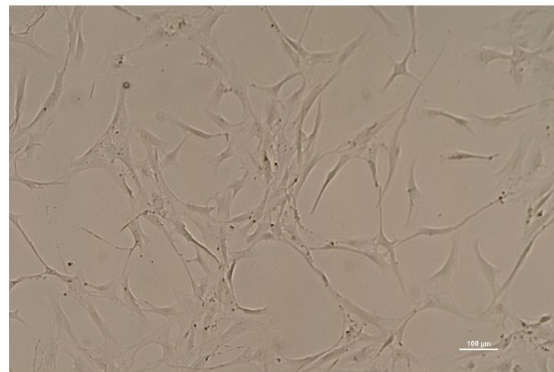
Кроме того, в данной работе были использованы культуры клеток глиом человека AS1, AS2, MG1, MG2 и MG4, ранее полученные из образцов опухолей пациентов сотрудниками лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск) (Рисунок 10).

Характеристики опухолей, из образцов которых были получены культуры, представлены в Таблице 4.

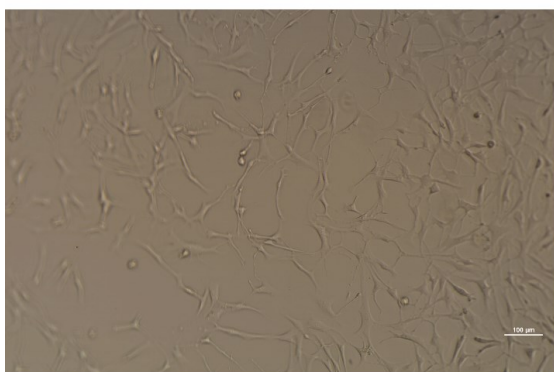
BR1.20



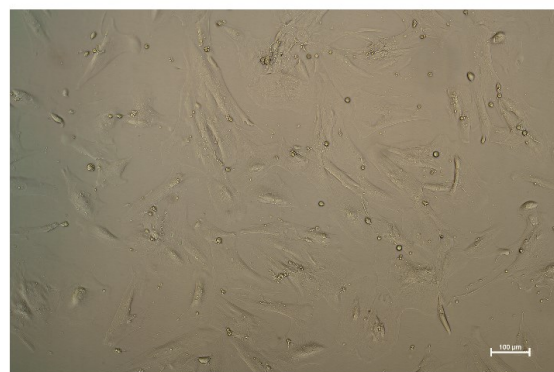
BR3.20



BR2.20



BR4.21



BR5.21

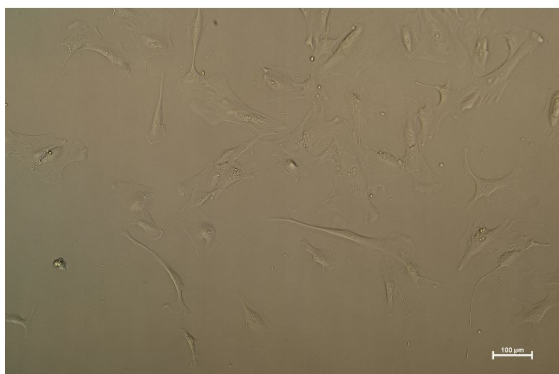


Рисунок 9. Микрофотографии клеток культур глиом человека, полученных в данной работе из образцов опухолей пациентов. Микроскопия в проходящем свете. Увеличение 100X.

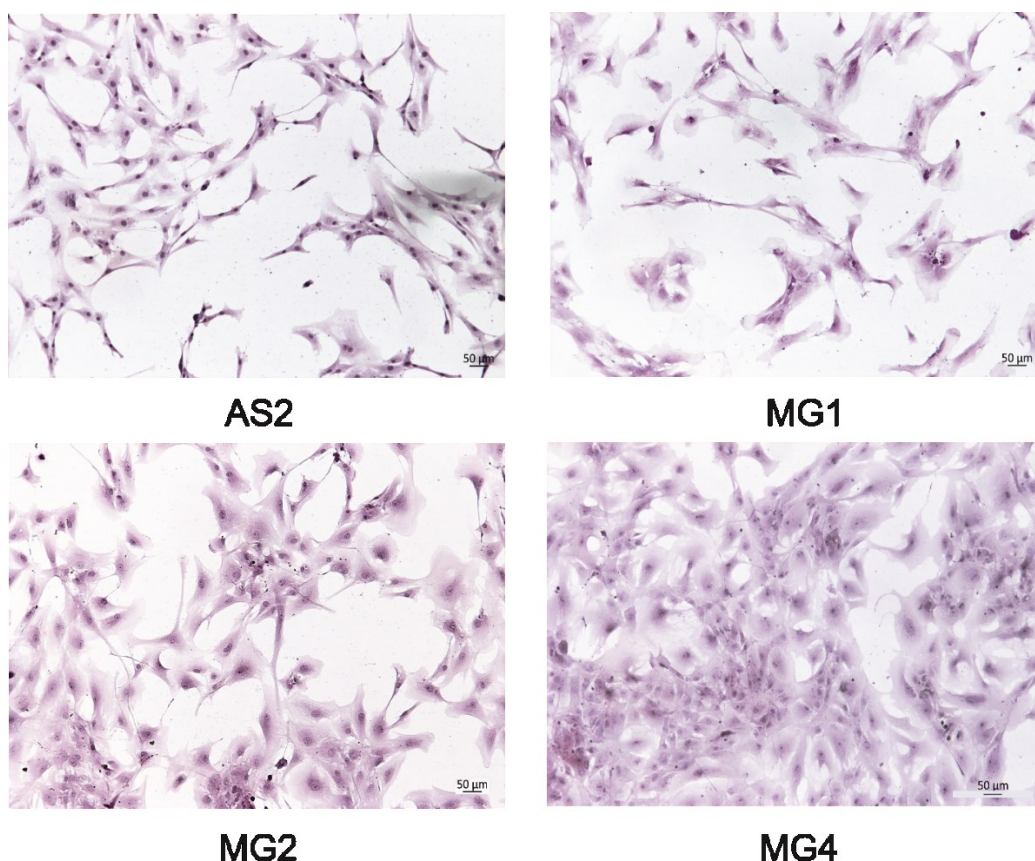


Рисунок 10. Культуры клеток глиом, полученные из образцов опухолей пациентов и используемые в работе. Окрашивание гематоксилином и эозином. Микроскопия. Увеличение 126X.

Таблица 4. Клиническая характеристика культур клеток глиом, полученных из образцов опухолей пациентов и используемых в работе.

Культура	Степень злокачественности	Характеристики, полученные при гистологическом анализе первичной опухоли*
MG1	4	GFAP+, Ki-67 25%
MG2	4	<i>IDH</i> дикого типа, GFAP+, Ki-67 20%
MG4	4	<i>IDH</i> дикого типа, GFAP+, Ki-67 25%
AS1	3	<i>IDH</i> мутантный фенотип, GFAP+, Ki-67 15%, коделеция 1p19q
AS2	3	<i>IDH</i> мутантный фенотип, GFAP+, Ki-67 7-9%, S100+
BR1.20	4	Данные не предоставлены
BR2.20	2	<i>IDH</i> мутантный фенотип, Ki-67 3-4%
BR3.20	4	<i>IDH</i> дикого типа, GFAP+, Ki-67 12-14%, S100+
BR4.21	4	<i>IDH</i> мутантный фенотип, GFAP+, Ki-67 15-17%, S100+, ATRX+
BR5.21	3	<i>IDH</i> мутантный фенотип, GFAP+, Ki-67 8-10%, S100+

\*данные получены от Мишинова С.В. (к.м.н., с.н.с., врач-нейрохирург новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, г. Новосибирск). GFAP

– глиальный кислый фибриллярный белок, маркер повреждения глиальных клеток; Ki-76 – маркер пролиферации клеток; S100 – маркер активации астроглии.

Известно, что полученные от пациента опухолевые клетки при культивировании в средах, содержащих сыворотку, подвергаются дифференцировке, что часто приводит к потере туморогенного потенциала культуры [253]. Согласно литературным данным, культивирование клеток, полученных от пациента, в среде без сыворотки и с добавлением факторов роста и питательных добавок позволяет максимально сохранить фенотип и генотип первичной опухоли, а также молекулярные и фенотипические особенности стволовых опухолевых клеток [254]. Культивирование клеток в условиях, позволяющих сохранять свойства стволовых опухолевых клеток и их туморогенный потенциал, дает возможность изучать молекулярно-генетические характеристики опухоли и её чувствительность к действию противоопухолевых агентов на модели, наиболее адекватно отражающей особенности первичной опухоли. Известно, что стволовые опухолевые клетки глиобластомы при культивировании в бессывороточных условиях и с добавлением факторов роста, таких как EGF (эпидермальный фактор роста) и FGF (фактор роста фибробластов), способны образовывать нейросферы [255]. Кроме того, было показано, что культуры клеток глиобластомы, полученные из образцов опухолей пациентов и культивируемые в виде нейросфер, сохраняют способность образовывать опухоли при ксенотрансплантации иммунодефицитным животным [254]. Полученные от пациентов культуры глиом, содержащие нейросферы, широко применяются в исследованиях глиальных опухолей и их ответа на противоопухолевые препараты. Так, на клетках культур глиобластомы, полученных от пациентов и культивируемых в условиях образования нейросфер, показана консервативность экспрессии B7-H3 (белок гомолога 3 B7, также известный как CD276). Кроме того, эти клетки обладают чувствительностью к терапии B7-H3-направленными CAR-T клетками [256]. При исследовании действия темозоломида, доксорубицина и паклитаксела на клетки глиобластомы, культивируемые в условиях формирования нейросфер, было продемонстрировано, что эти клетки менее чувствительны к действию химиотерапевтических препаратов, чем при культивировании в стандартных условиях с сывороткой [257]. Торможение роста ксенографтов, полученных при интракраниальной трансплантации животным клеток культур глиобластомы, полученных от пациентов и содержащих нейросферы, показано при лечении ингибитором  $\alpha$ -секретазы MRK003 [258].

Несмотря на то, что опухоли, полученные при трансплантации опухолевых клеток человека лабораторным животным, всё же имеют молекулярные отличия от первичной

опухоли, подобные модели являются одними из наиболее релевантных для исследований *in vivo*, поскольку сохраняют большее, по сравнению с иммортализованными культурами, сходство с первичной опухолью пациента как на молекулярно-генетическом и патоморфологическом уровнях, так и на уровне ответа на противоопухолевую терапию.

Клетки полученных культур глиом из образцов опухолей пациентов культивировали в условиях, позволяющих инициировать и поддерживать рост нейросфер, описанных в **пункте 2.2.3**. Оказалось, что клетки не всех полученных культур способны формировать нейросферы. Культуры клеток, способных образовывать нейросферы, были обозначены как MG1ns, BR1.20ns, BR2.20ns, BR3.20ns и BR5.21ns (Рисунок 11).

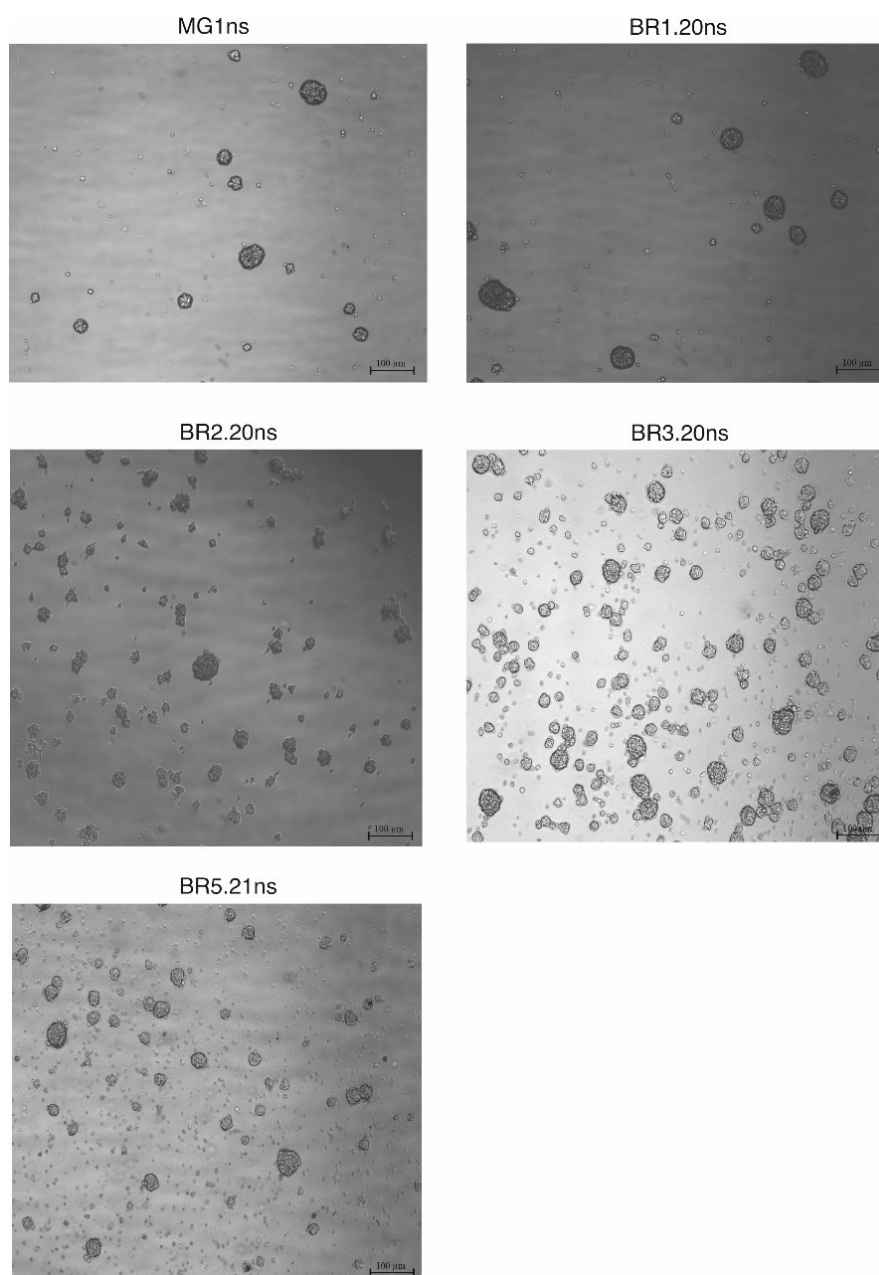


Рисунок 11. Полученные из образцов опухолей пациентов культуры глиом человека MG1ns, BR1.20ns, BR2.20ns, BR3.20ns и BR5.21ns, способные формировать нейросферы. Получены при культивировании клеток MG1, BR1.20, BR2.20, BR3.20 и BR5.21 в среде без



сыворотки и с добавлением факторов роста и питательных добавок. Микроскопия, увеличение 100X.

### **3.1.2. Характеризация клеток immortalized линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов**

Одной из основных проблем при разработке эффективных методов лечения глиом является внутриопухолевая гетерогенность на клеточном уровне, то есть наличие в опухоли клеток с различными молекулярными, генетическими и морфологическими характеристиками [259]. На основании наличия и соотношения генетических aberrаций различают 4 подтипа глиальных опухолей: пронеуральный, нейральный, мезенхимальный и классический [260]. Глиомы классического подтипа характеризуются повышенной экспрессией гена *EGFR* и потерей гетерозиготности по 10 хромосоме. Мезенхимальный подтип определяется мутациями в генах *NF1*, *PTEN* и низкой амплификацией гена *EGFR* по сравнению с остальными подтипами глиом. Пронеуральный подтип характеризуется мутациями в генах *PDGFRA*, *TP53*, *IDH1*, а для нейрального подтипа характерны мутации в гене *TP53*, амплификация гена *EGFR*, делеции в гене *CDKN2A* [261]. Исследование транскриптома клеток первичных опухолей показало, что одна опухоль может содержать клетки, относящиеся к трем разным молекулярным подтипам, что обуславливает способность опухолевых клеток адаптироваться к различным метаболическим условиям [261].

Также, исходя из молекулярных особенностей глиом, выделяют два типа опухолей - IDH мутантный и дикого типа [18]. Пациенты с глиомами с мутацией гена *IDH1* имеют более благоприятные прогноз общей выживаемости [43]. Помимо мутации в гене, кодирующем IDH, мутации в других генах (*MGMT*, *EGFR*, *PDGFRA*, *LOH*, *TP53*) также часто рассматривают в качестве прогностических маркеров.

Значительный вклад в устойчивость глиом к традиционной противоопухолевой терапии вносят стволовые опухолевые клетки (СОК) [262]. Маркеры, используемые для описания нейросфер и СОК, соответствуют маркерам нейральных стволовых/прогениторных клеток и эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) [263]. Среди нейральных маркеров наиболее распространенными являются CD133, CD15, CD44, CD171 и CD70 – рецепторы или лиганды, участвующие в межклеточных взаимодействиях и являющиеся компонентами каскадов определенных сигнальных путей. Наиболее распространенными среди маркеров эмбриональных стволовых клеток являются SOX-2 (SRV(определяющая пол область Y-хромосомы)-бокс-2), с-Мус (протоонкоген, белок миелоцитоматоза), OCT-4 (октамер-связывающий транскрипционный фактор 4) и NANOG

(North American Network Operators' Group), являющиеся транскрипционными факторами, которые участвуют в самообновлении недифференцированных ЭСК (эмбриональные стволовые клетки) [32,264].

Представленность CD133, CD44, CD15, CD171 на клетках immortalized линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов, в данной работе оценивали методом проточной цитометрии с использованием соответствующих антител. Согласно полученным данным, в исследуемых культурах глиом человека количество клеток, несущих маркеры СОК, значительно различаются (Таблица 5, Приложение Б).

Считают, что нейросферы содержат большее количество СОК, в частности клеток, несущих маркеры CD133 и CD44. Однако, согласно данным проточной цитометрии, мы наблюдали снижение количества CD133<sup>+</sup>-клеток в культурах BR1.20ns, BR3.20ns и MG1ns, содержащих нейросферы, по сравнению с клетками, культивируемыми в стандартных условиях. В культурах BR2.20ns, BR3.20ns, BR5.21ns и MG1ns снижалось количество CD44<sup>+</sup>-клеток (Таблица 5, Приложение Б Рисунок Б1). Вероятно, наблюдаемый нами феномен обусловлен труднодоступностью СОК в составе нейросферы. Формирование подобных 3D-структур происходит с образованием в центре некротического ядра, которое может включать в себя основной пул родительских СОК, сформировавших нейросферу.

CD171<sup>+</sup> клетки присутствовали в культурах BR4.21, MG1 и BR1.20. При этом, в клетках культур, содержащих нейросферы, данный маркер не детектировался (Таблица 5, Приложение Б Рисунок Б2). CD15<sup>+</sup>-клетки были обнаружены в культурах U87 MG, U343 MG, BR4.21 и MG1ns (Таблица 5, Приложение Б Рисунок Б3). В культуре MG1 CD15-положительные клетки отсутствовали. Культура BR4.21 была единственной из исследуемых, на клетках которой были представлены все четыре анализируемых маркера (CD133, CD44, CD15 и CD171). Данная культура была получена из образца глиомы 4 степени злокачественности и не обладала способностью формировать нейросферы.



Таблица 5. Представленность клеток, несущих поверхностные маркеры стволовых опухолевых клеток, в исследуемых культурах глиом человека

Культура	Grade*	CD133+ %	CD44+ %	CD133/ CD44+ %	CD15+ %	CD171+ %	EGFR+ %	PDGFRA+ %
U87 MG	4	0.13	7.53	0	6.00	0	99.00	0
U343 MG	4	2.48	15.89	0.59	50.11	0	99.10	0.42
MG1	4	1.11	52.53	0.81	0	4.71	n/a	n/a
BR1.20	4	15.09	67.71	17.23	0.31	24.00	0.33	1.47
BR3.20	4	3.83	90.99	3.69	0	0	39.70	0
BR4.21	3	9.9	78.86	9.56	1.95	20.40	0	0.19
AS2	3	0.77	79.11	0.71	0	0	64.42	0.13
BR5.21	3	0.57	34.77	0.37	0	0	0	0
BR2.20	2	0	47.91	0	0	0	0	0
MG1ns	4	0	86.44	0	48.63	0	n/a	n/a
BR1.20ns	4	0.77	56.47	0.67	0	0.16	n/a	n/a
BR3.20ns	4	0	59.25	0	0	0	n/a	n/a
BR5.21ns	3	0	12.11	0	0	0	n/a	n/a
BR2.20ns	2	0	12.46	0	0	0	n/a	n/a

\*-степень злокачественности первичной опухоли; n/a – данные отсутствуют.

Гиперэкспрессия гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) является общим отличительным признаком злокачественных новообразований, в том числе глиом, особенно классического подтипа. Инвазивный характер роста глиом обусловлен многочисленными факторами роста и обилием их рецепторов, в том числе, EGFR может активировать пути, реализация которых способствует активной пролиферации опухолевых клеток [32]. Рецептор тромбоцитарного фактора роста  $\alpha$  (PDGFRA), подобно EGFR, является рецептором для специфических факторов роста, и его гиперэкспрессия также может привести к неконтролируемому росту клеток. Мутация в гене *PDGFRA* почти всегда присутствует вместе с мутацией в гене *IDH*. Общая выживаемость PDGFRA-позитивных пациентов является наибольшей и может достигать 10 лет [32]. В данной работе оценка представленности данных рецепторов на исследуемых клетках глиом была так же проведена методом проточной цитометрии.

Культуры U87 MG, U343 MG, MG1, BR1.20, BR2.20, BR3.20, BR4.21, BR5.21 и AS2 характеризуются отсутствием либо низким уровнем (1,47% в культуре BR1.20) PDGFRA (Таблица 5, Приложение Б Рисунок Б4). Клетки культур U87 MG и U343MG были полностью положительны по EGFR. В то время как в культурах AS2, BR3.20 и BR4.21 популяция EGFR- положительных клеток была весьма малочисленна (Таблица 5, Приложение Б Рисунок Б5). Отсутствие EGFR и PDGFRA маркеров в клетках некоторых культур может свидетельствовать в первую очередь об отсутствии экспрессии их генов. Также возможно наличие мутаций в областях генов, которые кодируют участки взаимодействия белка со специфическими антителами.

Таким образом, уровень представленности маркеров CD133, CD44, CD15, CD171, EGFR и PDGFRA в клетках исследованных культур не зависел от степени злокачественности первичной опухоли. Так, в культуре AS2 (2 степень злокачественности) количество CD44+ клеток было выше (78,4%), чем в культуре MG1 (4 степень злокачественности) и культуре BR4.21 (4 степень злокачественности) (51,7% и 69,3%, соответственно). Количество EGFR+ клеток в культуре AS2 было так же выше (64,4%), чем в культуре BR4.21 (0,08%).

Как было отмечено выше, некоторые транскрипционные факторы могут быть использованы в качестве отличительных маркеров для идентификации СОК. SOX-2 играет важную роль в самовозобновлении, пролиферации и нейрогенной дифференциации нейральных стволовых клеток [265,266]. В злокачественных глиомах данный фактор участвует в поддержании стволовых опухолевых клеток [267–269], которые, как известно, вовлечены в формирование резистентности к терапии. Также нарушения в регуляции

протоонкогена с-Мус отмечены в клетках различных типов опухолей, где он участвует в поддержании злокачественности и стволовости СОК [270].

В данной работе уровень маркеров с-Мус и SOX-2 в клетках исследованных культур оценивали методами ОТ-ПЦР. Для оценки уровня экспрессии генов *MYC* и *SOX2* были получены РНК клеток культур MG1, BR1.20, BR2.20, BR3.20, BR4.21, BR5.21 и AS2, а также культур MG1ns, BR1.20ns, BR2.20ns, BR3.20ns и BR5.21ns.

Согласно полученным данным в клетках культур BR2.20ns и BR3.20ns, содержащих нейросферы, экспрессия *MYC*, чем в клетках, соответствующих адгерентных культур. В клетках культуры BR3.20 в адгерентных условиях экспрессии *MYC* не было выявлено. Клетки культуры BR5.21ns характеризовались более низким, либо сравнимым с клетками BR5.21 уровнем экспрессии исследуемых генов (рисунок 12). Также для клеток всех исследуемых культур уровни экспрессии генов *MYC* и *SOX2* так же не коррелировали со степенью злокачественности первичной опухоли.

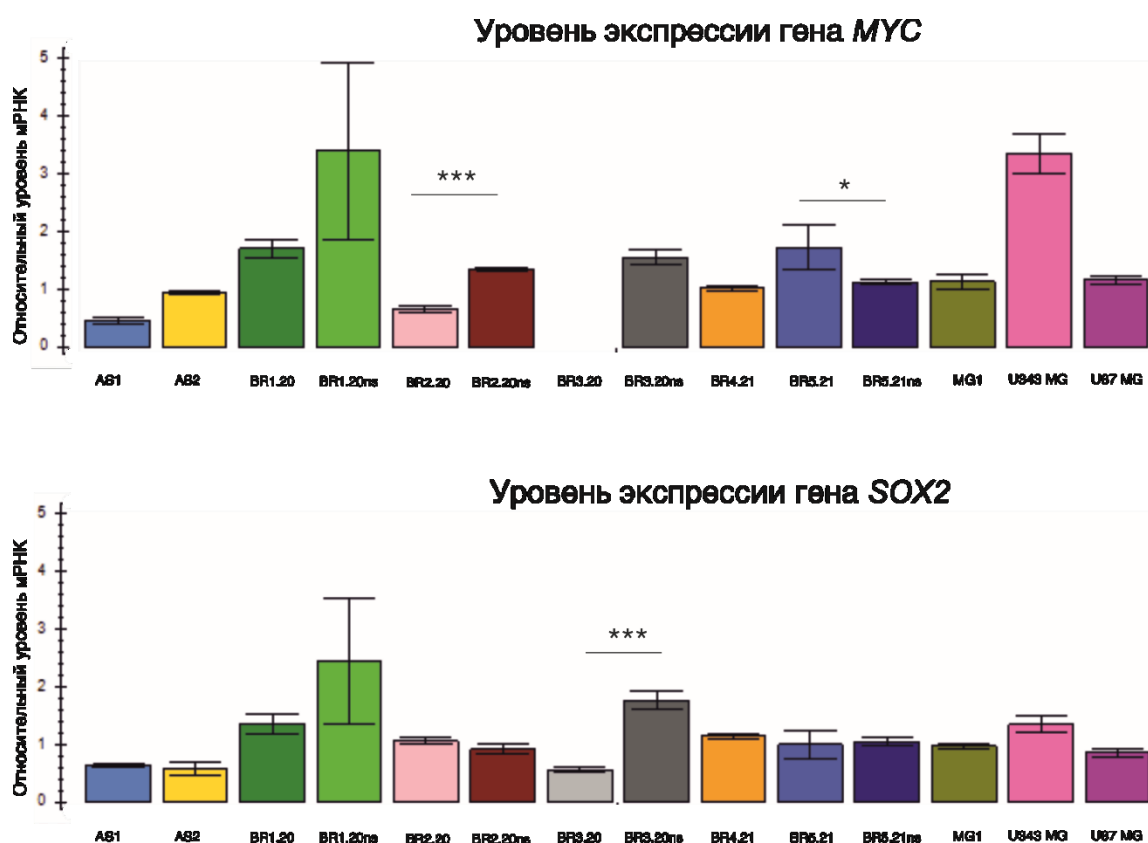


Рисунок 12. Оценка уровня экспрессии генов *SOX2* и *MYC* в клетках иммортализованных линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов, методом ОТ-ПЦР (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). Представлены средние значения  $\pm$ SD трех независимых экспериментов. Нормализацию образцов проводили по уровню генов

домашнего хозяйства *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и *HPRT* (гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза).

Согласно полученным данным исследуемые маркеры стволовых опухолевых клеток, как CD133, CD44, CD15 и CD171, так и с-Мус и SOX-2 на разном уровне представлены в клетках культур, полученных из образцов опухолей различной степени злокачественности. При этом, обнаружена положительная корреляция между уровнями CD133 и CD171 в исследуемых культурах (коэффициент детерминации  $R^2=0.982$ , Рисунок 14).

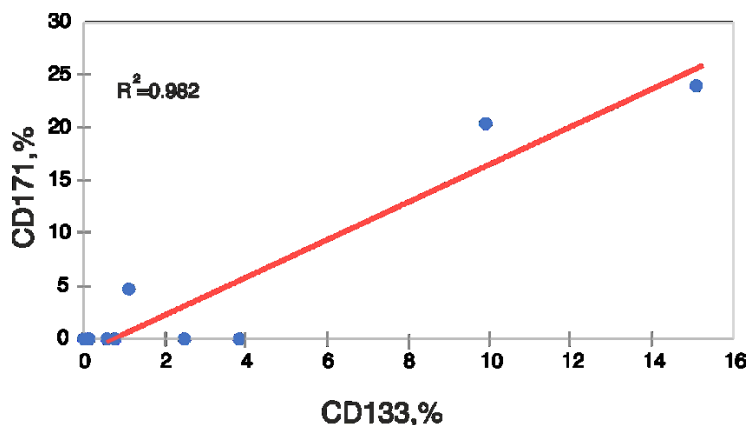


Рисунок 14. Корреляция между количеством CD133- и CD171-положительных клеток в исследуемых культурах глиом человека.

### 3.2. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении клеток иммортализованных линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов

В рамках данной работы исследование цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом человека проводили как на клетках иммортализованных линий глиобластомы U87 MG и U343 MG, так и на клетках культур, полученных из образцов опухолей пациентов (MG1, MG4, BR1.20, BR2.20, BR3.20, BR4.21, BR5.21 и AS2), в том числе содержащих нейросферы (MG1ns, MG4ns, BR1.20ns, BR2.20ns, BR3.20ns и BR5.21ns).

Согласно полученным данным клетки различных культур обладают разной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact, что не зависит от степени злокачественности первичной опухоли ( $R^2=0.037$ ). Клетки астроцитом BR2.20 и AS2 (3 степень злокачественности) оказались наиболее чувствительны к действию VV-GMCSF-Lact. Астроцитом BR5.21 и глиобластома BR4.21 (4 степень злокачественности) были наиболее устойчивы к вирусу (Таблица 6, Приложение В Рисунки В1-В3).

Чувствительность к вирусу различалась также в парах «адгерентная культура – культура, содержащая нейросферы», соответствующих культур. Так, клетки культуры MG1ns были чувствительнее к вирусу, чем клетки MG1. В то время как клетки культур BR1.20ns, BR3.20ns и BR2.20ns, напротив, оказались более устойчивы к действию вируса, чем BR1.20, BR3.20 и BR2.20, соответственно (Таблица 6, Приложение В Рисунки В1-В3).

Известно, что вирус осповакцины использует EGFR-сигнальный каскад для повышения эффективности распространения инфекции [118]. На основании исследования представленности EGFR<sup>+</sup>-популяции клеток в культурах с различной чувствительностью к вирусу можно сделать вывод, что EGFR-сигнальный путь не является основным сигнальным каскадом, обуславливающим эффективность цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом. Кроме того, чувствительность исследуемых культур к вирусу не коррелирует с уровнем всех маркеров, описанных в п.3.1.2. (рассчитанные коэффициенты детерминации ( $R^2$ ) ранжируются от 0.310 до 0.647 для разных маркеров).

Таблица 6. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом.

Культура клеток	CD50, БОЕ/клетку
U87 MG	0.1±0.028
U343 MG	0.06±0.008
MG1	0.12±0.02
MG1ns	0.007±0.0012
MG4	0.08±0.004
MG4ns	0.05±0.006
BR1.20	0.006±0.0004
BR1.20ns	0.07±0.005
BR3.20	0.02±0.0015
BR3.20ns	0.16±0.03
BR2.20	0.00004±0.000007
BR2.20ns	0.0033±0.0005
BR4.21	0.65±0.07
BR5.21	0.5±0.018
BR5.21ns	0.7±0.21
AS2	0.00002±0.000003

CD50 – множественность инфекции, вызывающую гибель 50% клеток.

Таким образом, выявление механизмов, определяющих чувствительность клеток глиом к цитоксическому действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, необходимо для дальнейшей разработки эффективных стратегий виротерапии опухолей головного мозга.

### **3.3. Оценка противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы человека в модели ксенографтов**

#### **3.3.1. Противоопухолевая и антиметастатическая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении опухолей U87 MG и U343 MG глиобластомы человека**

Для оценки противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact использовали модель подкожных ксенотрансплантатов. В качестве опухолевых моделей были использованы клетки immortalized линий глиобластомы человека U87 MG и U343 MG.

Мышам с подкожно трансплантированными опухолями U87 MG и U343 MG объемом 100–120 мм<sup>3</sup> внутриопухолево вводили VV-GMCSF-Lact в дозе 10<sup>7</sup> БОЕ/мышь. Курс терапии состоял из 3 – 4 инъекций с интервалом 7 дней. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор по той же схеме в тех же объемах. Торможение роста опухоли определяли путем сравнения объемов опухолей животных опытной и контрольной групп.

Эффективность лечения вирусным препаратом оценивали по индексу торможения роста опухоли (ТРО), который рассчитывали по формуле 2 (пункт 2.3.9).

Через двадцать один день после первой инъекции вируса (или через шесть дней после третьей инъекции) ингибирование роста опухоли U343 MG составило 84%. При этом, около 30% опухолей были полностью элиминированы (Рисунок 15А). При лечении мышей с опухолями U87 MG подавление роста опухоли через 22 дня после первой инъекции составило 68%. Поскольку в данном случае не было достигнуто эффективного ингибирования роста опухоли, была проведена четвертая инъекция VV-GMCSF-Lact. На 53 день эксперимента (Рисунок 15Б) ингибирование роста опухоли U87 MG составило 96%. Необходимо отметить, что эффекта полной элиминации опухолей в случае U87 MG достигнуто не было. Животные контрольной группы были подвергнуты эвтаназии на 37-е сутки эксперимента в связи с развитием в опухолях очагов некроза.

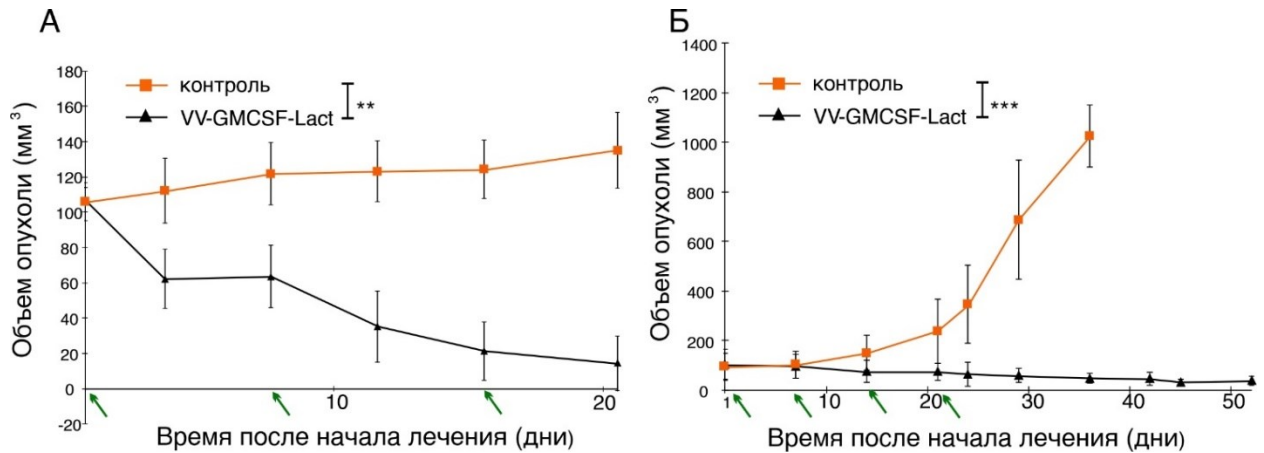


Рисунок 15. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении подкожных ксенографтов глиобластомы человека. А – динамика изменения объемов подкожно-трансплантированных опухолей U343 MG при внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact,  $**p < 0.01$  на 20 день от начала лечения; Б – динамика изменения объемов подкожно-трансплантированных опухолей U87 MG при внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact,  $***p < 0.001$  на 36 день от начала лечения. Представлены средние значения  $\pm$ SD (стандартное отклонение) группы из шести мышей. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Кроме того, была проведена оценка антиметастатической активности VV-GMCSF-Lact. Ранее уже было показано, что рекомбинантный вирус осповакцины VVdGF-GFP2, имеющий делеции генов TK и VGF и вставку гена зеленого флуоресцентного белка (GFP2), при внутриопухолевом введении способен достигать модельных метастазов. Мышам линии nude подкожно прививали клетки эпидермоидной карциномы человека A431 в двух удаленных друг от друга точках. Один из ксенографтов использовали для лечения рекомбинантным вирусом осповакцины, а второй служил искусственным метастазом. Согласно данным УФО-изображений мышей уже через 2 суток после введения в опухоль VVdGF-GFP2 регистрировался как в опухоли, так и в метастазе [271].

Чтобы оценить, способен ли VV-GMCSF-Lact не только достигать метастазов глиобластомы, но и подавлять их развитие, была использована описанная в работе 13 модель метастазирования: подкожную трансплантацию клеток U343 MG проводили с разных сторон тела мышей SCID для формирования «опухоли» и «метастаза». Объем опухолей в начале лечения составлял около 100 – 120 мм<sup>3</sup>. Животным экспериментальной группы внутриопухолево вводили VV-GMCSF-Lact в дозе 10<sup>7</sup> БОЕ/мышь курсом из трех

инъекций, с интервалом между инъекциями 7 дней. Животные контрольной группы получали физиологический раствор по той же схеме. На протяжении эксперимента измеряли объемы как «опухоли», так и «метастаза». На 7-й день после последней инъекции наблюдалось статистически значимое ( $p < 0.05$ ) уменьшение объемов как «опухоли», так и «метастаза» у мышей, получавших VV-GMCSF-Lact, по сравнению с животными контрольной группы (Рисунок 16). Индекс торможения роста опухоли (ТРО) составил 93.9% для опухоли и 85.2% для «метастаза».

Несмотря на то, что глиомы редко метастазируют за пределы головного мозга, возможны случаи попадания опухолевых клеток в экстракраниальное пространство, кроме того, и хирургическое вмешательство может являться причиной экстракраниального распространения клеток глиобластомы [272]. Более того, хирургическая резекция, терапия первой линии при опухолях головного мозга, сопровождается лучевой терапией, которая может способствовать сосудистой инвазии и диссеминации опухоли, поскольку неоваскуляризация считается одной из причин метастазогенеза [273]. Известно, что для глиом характерен сильный инвазивный потенциал как стволовых опухолевых клеток, так и дифференцированных клеток [274]. Распространяясь в окружающие ткани головного мозга, клетки глиом вызывают либо рецидив опухоли, либо метастазы. Наиболее распространены метастазы в белое вещество мозга [275]. Диссеминация клеток глиом может также происходить через спинномозговую жидкость или за счёт лимфодренажа [276], при этом наиболее частыми местами экстракраниального метастазирования являются легкие, плевра, лимфатические узлы и кости [277]. Поэтому данный вопрос заслуживает внимания при разработке новых подходов к терапии глиом.

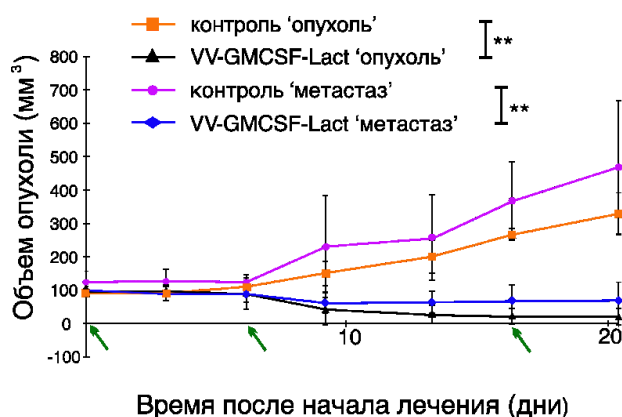


Рисунок 16. Динамика развития «опухоли» и «метастаза» подкожно трансплантированной глиобластомы U343 MG при лечении VV-GMCSF-Lact. Внутритропухолевое введения.  $**p < 0.01$  на 21-ый день эксперимента. Представлены



средние значения $\pm$ SD группы из шести мышей. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Согласно результатам нашего исследования, VV-GMCSF-Lact способен обнаруживать метастазы и проявляет значительную антиметастатическую активность при внутриопухолевом введении. Поскольку в настоящее время предпочтительным методом доставки онколитических вирусов при терапии опухолей головного мозга все же является внутриопухолевое введение, этот результат имеет принципиальное значение.

Ксенотрансплантаты, полученные из клеток immortalized линий и использованные в описанных экспериментах в качестве опухолевых моделей, имеют ряд неоспоримых преимуществ: высокая скорость приживления опухолевых клеток, воспроизводимость роста опухоли и результатов [278]. Однако immortalized клетки при длительном культивировании подвергаются дифференцировке, и полученные ксенотрансплантаты не отражают клеточную гетерогенность первичной опухоли [251,254]. Генотипы таких моделей также отличаются от генотипов исходных опухолей пациентов [279,280]. Таким образом, ксенотрансплантаты, полученные из клеток immortalized линий, не вполне отражают ответ глиобластомы на терапию, и для адекватной оценки противоопухолевой эффективности препаратов в доклинических исследованиях необходимо использовать и другие, более релевантные опухолевые *in vivo* модели.

### **3.3.2. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении ксенографтов глиобластомы человека, полученной из образца опухоли пациента**

Известно, что клетки культур, полученных из образцов опухолей пациентов, культивированные в условиях формирования нейросфер, продолжают сохранять гистологическое и молекулярно-генетическое сходство с первичной опухолью [254,281]. Было показано, что мышинные модели опухолей, полученные из таких культур, имитируют многие аспекты первичной опухоли. Однако, с одной стороны, не все культуры клеток глиом человека, полученные от пациентов, способны образовывать нейросферы, и, с другой стороны, не все культуры, образующие нейросферы, являются туморогенными при трансплантации иммунодефицитным животным [282].

Культуры MG1ns и MG4ns глиобластомы человека, полученные из образцов опухолей пациентов в нашей лаборатории, были исследованы на способность образовывать опухоли при подкожной трансплантации мышам SCID. Было показано, что как MG1ns, так и MG4ns в среднем через 3 недели образовывали опухоли при трансплантации мышам

$5 \times 10^6$  клеток/мышь. Однако опухоли, образованные клетками MG4ns, развивались значительно быстрее и были в дальнейшем использованы для оценки противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact.

VV-GMCSF-Lact в дозе  $10^7$  БОЕ/мышь вводили мышам-опухоленосителям внутриопухолево, курсом из 4-х инъекций с интервалом между инъекциями 7 дней. Контрольные животные получали физиологический раствор по той же схеме. В результате проведенных экспериментов было показано, что VV-GMCSF-Lact эффективно подавляет рост опухоли MG4ns. Через 22 дня после первой инъекции вируса ингибирование роста опухоли составило 97%. При этом, 10% опухолей были полностью излечены к 58-му дню эксперимента (Рисунок 17). Животные контрольной группы были подвергнуты эвтаназии на 22-й день эксперимента, так как объемы опухоли составляли более  $2000 \text{ мм}^3$  и, согласно биоэтическим требованиям, превышали допустимые для дальнейшей работы с животными значения.

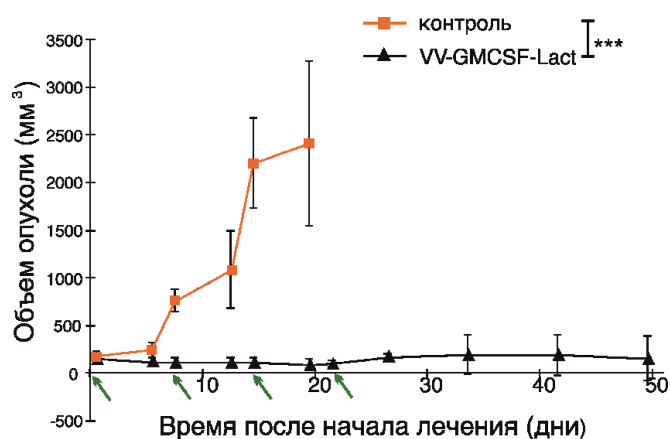


Рисунок 17. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении подкожно-трансплантированной глиобластомы MG4ns. \*\*\* $p < 0.001$  на 20 день от начала лечения. Представлены средние значения  $\pm$ SD группы из шести мышей. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Таким образом, показано, что VV-GMCSF-Lact обладает противоопухолевой и антиметастатической эффективностью в отношении глиобластомы человека *in vivo*, что доказывает перспективность его дальнейших исследований в качестве лекарственного препарата для терапии злокачественных новообразований головного мозга.

Следует отметить, что поскольку VV-GMCSF-Lact является иммунотерапевтическим препаратом полноценная оценка его противоопухолевого потенциала невозможна без учета реакции иммунной системы на введение лекарства. Таким образом, необходимо исследование противоопухолевой эффективности VV-

GMCSF-Lact в отношении опухолей, трансплантированных иммунокомпетентным животным.

#### **3.4. Биораспределение VV-GMCSF-Lact при внутривенном введении лабораторным животным**

Помимо исследования механизмов чувствительности опухоли к терапии, при разработке лекарственных средств для лечения опухолей головного мозга необходимо учитывать наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Хотя при развитии глиальных опухолей целостность ГЭБ часто нарушена, это не обязательно означает, что противоопухолевые средства беспрепятственно проникают в опухолевую ткань. Во-первых, некоторые участки ГЭБ могут сохраняться интактными [283], и во-вторых, формируется гематоопухолевый барьер (BBTB, blood–brain–tumor barrier). BBTB сходен с ГЭБ и образован высокоспециализированными эндотелиальными клетками [284,285]. Шлагетер и коллеги идентифицировали три различные популяции микрососудов глиом: (1) непрерывные нефенестрированные микрососуды, в которые поступление лекарственных средств происходит преимущественно путем пассивной диффузии; (2) непрерывные фенестрированные микрососуды, избирательно увеличивающие проницаемость по сравнению с нормальным мозгом; 3) микрососуды с эндотелиальными щелями, обладающие повышенной проницаемостью для всех водорастворимых соединений. Несмотря на то, что фенестры и щели внутри BBTB обеспечивают беспрепятственный транспорт низкомолекулярных терапевтических средств, эти поры достаточно узки, чтобы предотвратить эффективное прохождение противоопухолевых агентов свыше 500 Да [286,287].

В настоящее время доставка лекарственных препаратов для терапии глиом осуществляется следующими способами: системная доставка (внутривенное или внутриартериальное введение) и локальная доставка (интраназальное введение, доставка на твердых имплантатах, внутриопухолевое введение и доставка с усилением конвекции) [288]. Наиболее распространенным способом доставки онколитических вирусов является внутриопухолевое введение, так как при этом влияние на эффективность препарата таких факторов как наличие ГЭБ и BBTB, а также противовирусного иммунного ответа значительно снижается. В то же время, стоит отметить, что с точки зрения безопасности системное введение вирусных препаратов является предпочтительным, поскольку этот способ наименее инвазивен и позволяет избежать обратного заброса вирусной суспензии вверх по катетеру или игле при введении [289,290].

Для оценки способности VV-GMCSF-Lact проникать через ГЭБ, мы исследовали биораспределение вируса в органах и тканях здоровых мышей и мышей SCID с ортотопически трансплантированными опухолями U87 MG. VV-GMCSF-Lact вводили внутривенно в дозе  $5 \times 10^7$  БОЕ/мышь однократно. Через 7 дней после инъекции мышей подвергали эвтаназии и забирали кровь, опухоли и органы (печень, легкие, почки и головной мозг) для дальнейшего анализа методом ПЦР (полимеразная цепная реакция) в режиме реального времени. Работы по ортотопической трансплантации клеток глиобластомы U87 MG мышам линии SCID выполнены к.б.н., заведующим ЦКП "SPF-виварий" Завьяловым Е.Л. (ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск).

Полученные данные показали, что VV-GMCSF-Lact распределяется по всем органам и тканям, включая головной мозг. При этом у животных с трансплантированной опухолью количество вируса в опухоли было значительно выше, чем в других органах и тканях (Рисунок 16).

Следует также отметить, что у мышей с опухолью количество VV-GMCSF-Lact в нормальной ткани головного мозга было существенно выше, чем в других органах. Это может быть связано с инфильтрацией ткани мозга опухолевыми клетками, в которых вирус способен реплицироваться. Тем не менее, количество вируса в опухоли было значительно больше, чем в тканях мозга, что свидетельствует о репликации вируса именно в онкотрансформированных клетках.

При оценке биораспределения вируса в органах и тканях здоровых мышей было показано, что вирус способен проникать и через интактный ГЭБ (Рисунок 18). При этом, количество вируса в ткани мозга здоровых мышей значительно ниже ( $1.7 \times 10^4$  вирусных геномов/мг ткани), чем в ткани мозга мышей опухоленосителей ( $1.1 \times 10^7$  вирусных геномов/мг ткани), что свидетельствует об отсутствии репликации вируса.

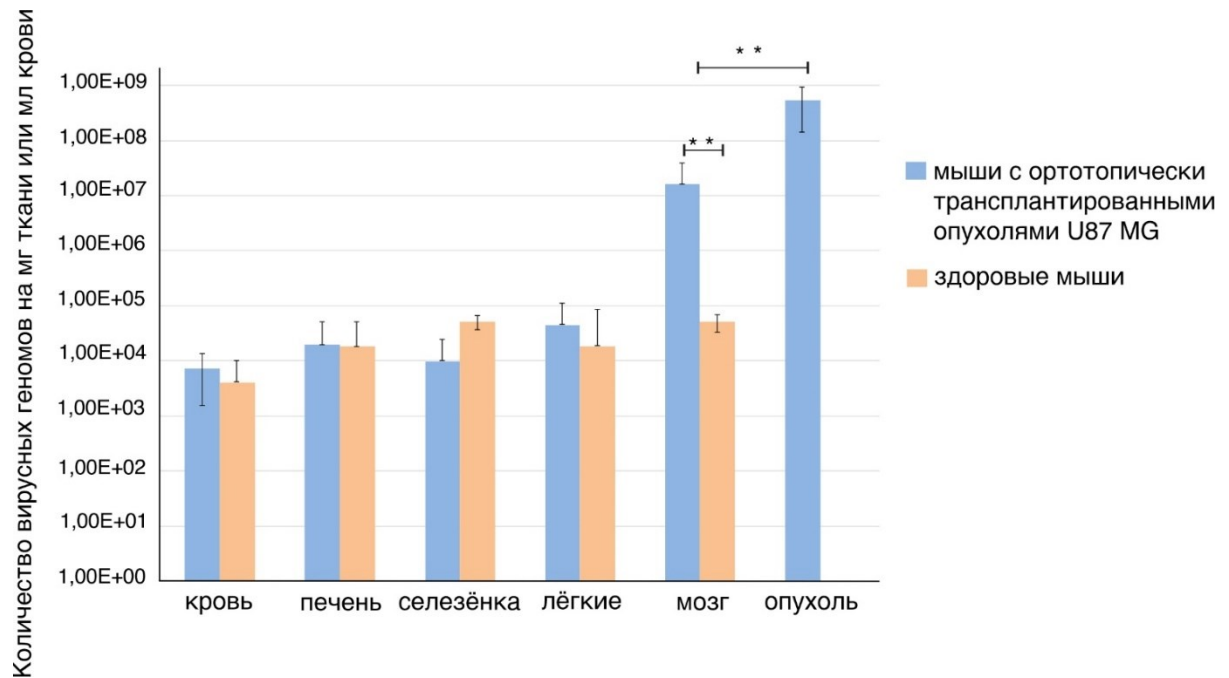


Рисунок 18. Биораспределение VV-GMCSF-Lact в организме здоровых животных и мышей-опухоленосителей при внутривенном введении. Представлены средние значения $\pm$ SD группы из шести мышей.  $**p < 0.01$ . Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Показано, что VV-GMCSF-Lact при внутривенном введении может проникать через ГЭБ как здоровых животных, так и мышей с ортотопически трансплантированной глиобластомой U87 MG. Способность вируса размножаться в опухолевых клетках обеспечивает дополнительное накопление вируса в опухолевой ткани.

Однако эффективность доставки вируса к опухоли может снижаться при наличии в крови вируснейтрализующих антител, особенно при повторном введении препарата. Вируснейтрализующие антитела снижают множественность инфекции и ограничивают терапевтический потенциал онколитического вируса [291]. Согласно литературным данным, активация наработки противовирусных антител происходит независимо от пути введения вируса [292–295]. Но при этом известно, что поксвирусы имеют множество белков, способных нарушать передачу сигналов иммунной системы хозяина и, таким образом, обходить иммунную защиту инфицированного организма [296]. По результатам многочисленных клинических испытаний препарата Реха-Вес, созданного на основе рекомбинантного штамма JX-594 вируса осповакцины, противоопухолевый эффект препарата не снижался, несмотря на высокий уровень антител к вирусу. Более того, наличие нейтрализующих антител у ранее вакцинированных пациентов также не оказывало значительного влияния на противоопухолевый эффект Реха-Вес [297]. При этом, методы,

позволяющие преодолевать вирус-нейтрализующий иммунный ответ, на сегодняшний день активно разрабатываются [296].

Таким образом, для успешного применения VV-GMCSF-Lact для терапии глиом необходимо как проникновение вируса через ГЭБ, так и его способность в достаточном количестве достигать опухоли и реплицироваться в опухолевых клетках.

### **3.5. Оценка эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении синграфтов глиомы C6 крысы**

#### **3.5.1. Оценка цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиомы C6 крысы**

На сегодняшний день многие препараты на основе онколитических вирусов находятся на различных стадиях клинических испытаний, и лишь немногие из них обеспечивают эффективную терапию опухолей. Это связано, в том числе, с тем, что используемые доклинические модели не способны полностью предсказать действие противоопухолевого агента на иммунодефицитных животных. Таким образом, для полноценного исследования действия онколитических вирусов на опухоль необходима иммунокомпетентная модель, отражающая реакцию иммунной системы организма на введение препарата. Одной из наиболее распространённых иммунокомпетентных моделей для исследования глиобластомы человека является глиома C6 крысы. Линия клеток глиомы C6 была получена в конце 1960-ых годов при многократном введении N-нитрозо-N-метилмочевины взрослым крысам линии Wistar-Furth [298]. Клетки глиомы C6 имеют общие гистопатологические и специфические опухолевые маркеры с глиобластомой человека: Показано, что клетки C6, как и клетки глиом человека, экспрессируют такие ростовые факторы, как EGF, PDGF-A, PDGF-B, IGF, VEGF и другие и их рецепторы. В клетках C6 наблюдаются мутации, присутствующие в клетках глиобластомы человека. Известно, например, что общий супрессор опухолей p16 имеет высокую частоту мутаций в клетках глиобластомы, и показано, что мутации в локусе *p16/CDKN2A/NK4A* также часто встречаются в клетках глиомы C6. Глиома C6 также характеризуется активацией Ras-пути. Кроме того, клетки C6 секретируют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и основной фактор роста фибробластов (bFGF), которые способствуют неоваскуляризации опухоли. Глиома C6 крысы может образовывать высокоангиогенную, инвазивную модель глиомы, которая имитирует многие морфологические характеристики глиобластомы человека [299]. Все вышеперечисленные свойства делают глиому C6 привлекательной моделью для изучения этого типа опухоли.

Кроме того, глиома С6 крысы является хорошо изученной и охарактеризованной опухолевой моделью, морфометрические показатели, гистопатологический и молекулярный профили этой опухоли подробно описаны, методики стереотаксической трансплантации клеток глиомы С6 в мозг лабораторных животных хорошо отработаны.

Таким образом, глиома С6 крысы является достаточно релевантной опухолевой моделью для оценки эффективности противоопухолевых препаратов. Исследование противоопухолевого потенциала рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины с использованием подобной модели позволит оценить степень вовлеченности иммунной системы в реакцию организма на введение вирусного препарата, в том числе влияние на эффективность терапии, а также оценить перспективность дальнейших исследований препарата в отношении глиомы человека.

В первую очередь была проведена оценка цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиомы С6 крысы (Рисунок 19).

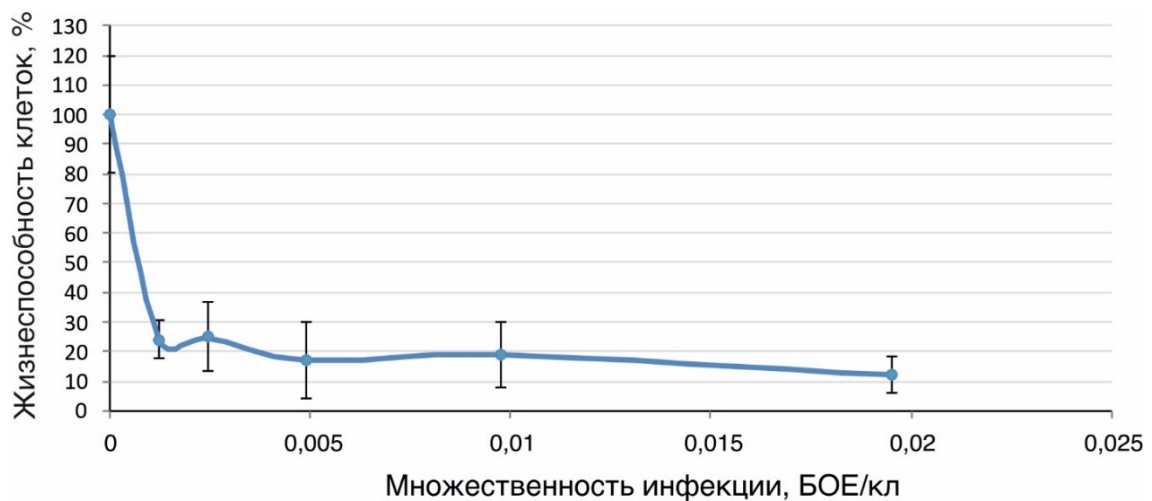


Рисунок 19. Изменение жизнеспособности клеток глиомы С6 крысы под действием онколитического вируса VV-GMCSF-Lact. Представлены средние значения жизнеспособности клеток относительно контроля  $\pm$  стандартное отклонение, рассчитанное по данным трех независимых экспериментов.

Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact составила 0.004 БОЕ на клетку, что свидетельствует о способности вируса эффективно подавлять жизнеспособность клеток глиомы С6 *in vitro*, и подтверждает перспективность дальнейшего использования глиомы С6 в качестве опухолевой модели *in vivo* на иммунокомпетентных животных.

### 3.5.2. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении ортотопически трансплантированной глиомы С6

Для оценки противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact *in vivo* самкам крыс линии Wistar ортотопически трансплантировали клетки глиомы С6 (Рисунок 20). Формирование опухолей отслеживали с помощью МРТ-сканирования. Работы по оценке противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении иммунокомпетентной модели глиомы С6 крысы выполнены совместно с к.м.н., с.н.с. лаборатории клеточных технологий Юсубалиевой Г.М. (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, г. Москва) и м.н.с. лаборатории биотехнологии Агеев А.Б. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). МРТ-сканирование крыс линии Wistar выполнено заведующим отделением общей рентгенологии, рентгеновской компьютерной и магнитно-резонансной томографии Губским И.Л. (ФЦМН ФМБА России, г. Москва).

Когда опухоли были сформированы, животных делили на группы по схеме, представленной в Таблице 2: контрольная группа 1 (2 крысы; 1 мл физраствора внутривенно); контрольная группа 2 (2 крысы; 50 мкл физраствора внутриопухолево); группа внутриопухолевого введения (9 крыс; доза вируса  $1.65 \times 10^7$  БОЕ в 50 мкл физраствора) и группа внутривенного введения (9 крыс; доза вируса  $3 \times 10^8$  БОЕ в 1 мл физраствора). Дозы препарата были определены на основании предварительных экспериментов. Курс терапии состоял из 3-х инъекций с интервалом 7 дней. Динамику развития опухолей оценивали с помощью МРТ-сканирования.

#### трансплантация опухолевых клеток

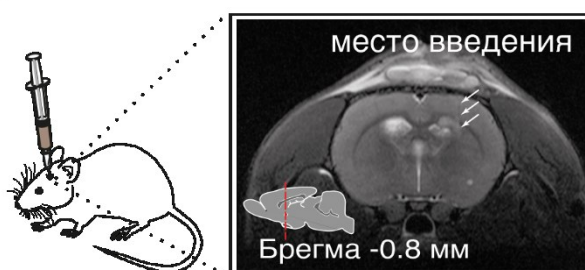


Рисунок 20. Интракраниальная трансплантация клеток С6 крысам линии Wistar.

Анализ МРТ-изображений опухолей в динамике позволяет сделать вывод об изменении характера роста опухоли под действием VV-GMCSF-Lact. Анализ МРТ-изображений крыс линии Wistar выполнен к.б.н., с.н.с. лаборатории генетики лабораторных животных Ромащенко А.В. (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). У животных контрольной



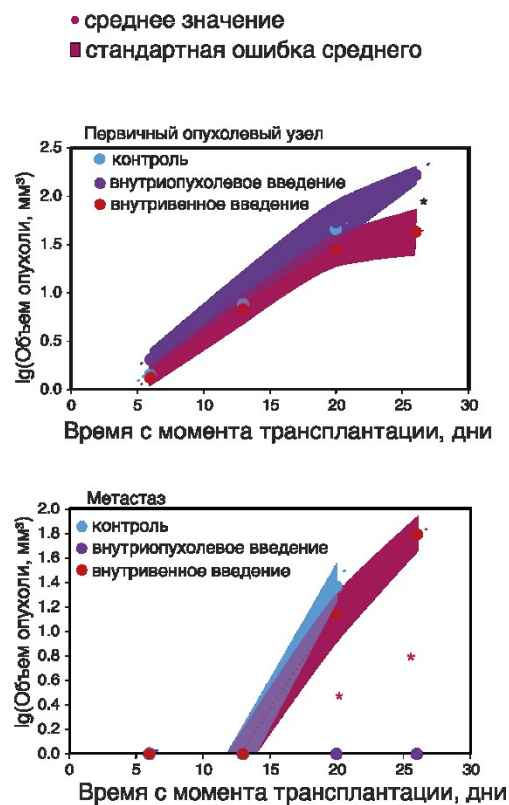
группы помимо основного опухолевого узла через 7 дней после последней инъекции можно наблюдать отдаленные очаги инвазивного роста глиомы (Рисунок 21А).

У животных, получавших вирус внутривенно, суммарные объемы опухолей меньше, чем у контрольных животных (Рисунок 21Б). Индекс торможения роста опухолей составил 60%. Однако, при внутривенном введении препарата (у 7 крыс из 9), как и в контрольной группе (у трех крыс из 4), наблюдается развитие отдаленных метастазов. При внутриопухолевом введении вируса отдаленных очагов не выявлено (Рисунок 21Б), хотя объемы опухолей у крыс, получавших вирус внутриопухолево, достоверно не отличались от контроля. При сравнении скорости роста опухолей животных, получавших лечение, можно сделать вывод, что при внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact происходит торможение развития опухоли (Рисунок 21В), несмотря на отсутствие значимых различий в средних объемах опухолей.

А



Б



В

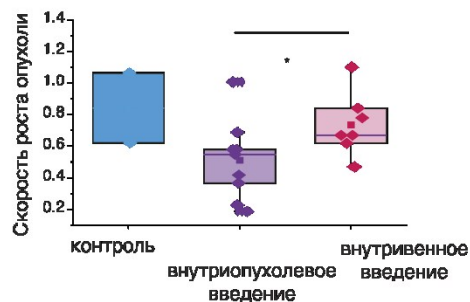


Рисунок 21. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы С6 крысы. А – МРТ-изображения опухоли и метастаза контрольной группы в динамике; Б – изменение объемов опухолей и метастазов глиомы С6 при внутривенном и внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact; В – скорость роста опухолей С6 при внутривенном и внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact. \* -  $p \leq 0.05$ . Представлены данные в виде «среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка». Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Об антипролиферативном эффекте VV-GMCSF-Lact при внутриопухолевом введении свидетельствует также снижение уровня Ki-67 (антиген Kiel 67) (Рисунок 22) Белок Ki-67 является маркером пролиферации. Индекс Ki-67 зависит от степени злокачественности опухоли и может являться предиктивным маркером у пожилых

пациентов [300]. Более того, уровень GFAP (глиальный кислый фибриллярный белок) (Рисунок 22) также снижается при внутриопухолевом введении вирусного препарата. GFAP – специфический биомаркер астроцитов, который играет важную роль в модуляции стабильности структуры цитоскелета, поддержании механического потенциала глиальных клеток и поддержке соседних нейронов [301]. Показано, что высокая иммуногистохимическая реакция на GFAP наблюдается при различных патологических состояниях ЦНС, в частности, при ишемии, травматическом повреждении мозга, воспалении, эпилепсии, нейродегенеративных заболеваниях [302]. Иммуногистохимический анализ опухолей С6 крысы выполнен в ФНКЦ ФМБА России (г. Москва) под руководством заведующего патологоанатомическим отделением д.м.н. Забозлаева Ф.Г. (ФЦМН ФМБА России, г. Москва).

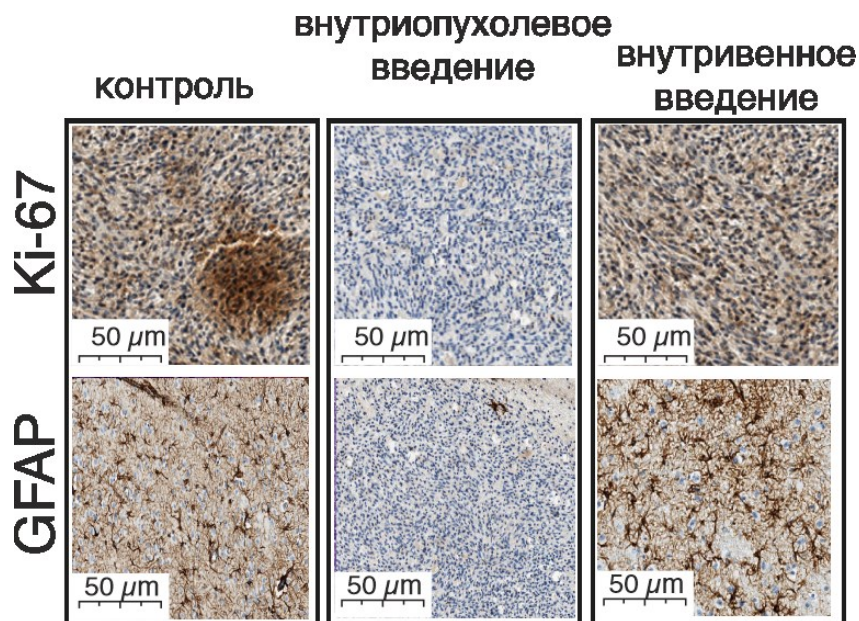


Рисунок 22. Иммуногистохимический анализ представленности маркеров Ki-67 и GFAP в опухолях С6 при внутривенном и внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact.

Таким образом, можно сделать вывод, что внутриопухолевое введение VV-GMCSF-Lact, оказывает деструктивное воздействие на опухоли С6. Несмотря на значимые морфологические изменения интракраниально трансплантированных опухолей С6 при терапии VV-GMCSF-Lact, различий в выживаемости животных опытных и контрольной групп обнаружено не было (Рисунок 23А). Однако одна крыса из группы внутриопухолевого введения прожила 66 дней с момента начала лечения. Стоит отметить, что это животное получило при первом введении меньшую дозу вируса из-за рефлюкса части препарата. Также, согласно данным МРТ-сканирования, у этого животного

наблюдалась элиминация основной массы опухолевой ткани (Рисунок 23Б). При сканировании в режиме T1 с контрастирующим гадолиний-содержащим агентом видно, что гадолиний накапливается лишь по периферии некротической капсулы. Поскольку гадолиний накапливается в тканях с повышенным кровоснабжением, в частности злокачественных опухолях, можно сделать вывод, что у данной крысы опухолевая масса практически полностью элиминирована в результате терапии с помощью VV-GMCSF-Lact. Анализ диффузионно-взвешенных МРТ-изображений (ДВ МРТ) также свидетельствует об элиминации опухоли. Метод ДВ МРТ позволяет получить изображения биологических тканей *in vivo*, взвешенные по диффузии молекул воды на микроструктурном уровне [303]. Количественная оценка МР-диффузии производится на основании определения абсолютного значения измеряемого коэффициента диффузии (ИКД). При высокой клеточной дифференциации, наличии воспалительных или фиброзных изменений, повышенном содержании высокобелковой жидкости диффузия молекул воды ограничивается и демонстрируются низкие значения ИКД. На диффузионной карте Рисунка 19Б видно, что в области, не накапливающей гадолиний, значение ИКД минимально, что может свидетельствовать о воспалительном процессе в данной области. Также можно предположить, что эта область характеризуется наличием признаков асептического абсцесса, поскольку показано, что низкие значения ИКД могут детектироваться при подобных состояниях [304].

По кривой выживаемости Каплана–Мейера (Рисунок 23А) видно, что при внутриопухолевом введении вирусного препарата в использованной дозе наблюдается ранняя гибель животных, вызванная, вероятно, значительными токсическими эффектами, обусловленными быстрой деструкцией опухолевой массы и последующим некрозом опухолевых клеток, сопровождающимся отеком тканей мозга [305]. Некротические клетки высвобождают такие факторы, как HMGB1 (high-mobility group protein B1), который стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов соседними клетками. В результате происходит привлечение к месту воспаления лейкоцитов и фагоцитов, что создает дополнительное повреждение окружающих тканей [305]. Кроме того, ГМ-КСФ, экспрессируемый VV-GMCSF-Lact, также участвует в развитии воспаления. Также известно, что развитие поствакцинального энцефалита является хоть и редким, но возможным побочным эффектом при вакцинации вирусом осповакцины [306], что может обуславливать токсический эффект при терапии крыс с ортотопически трансплантированными опухолями С6.

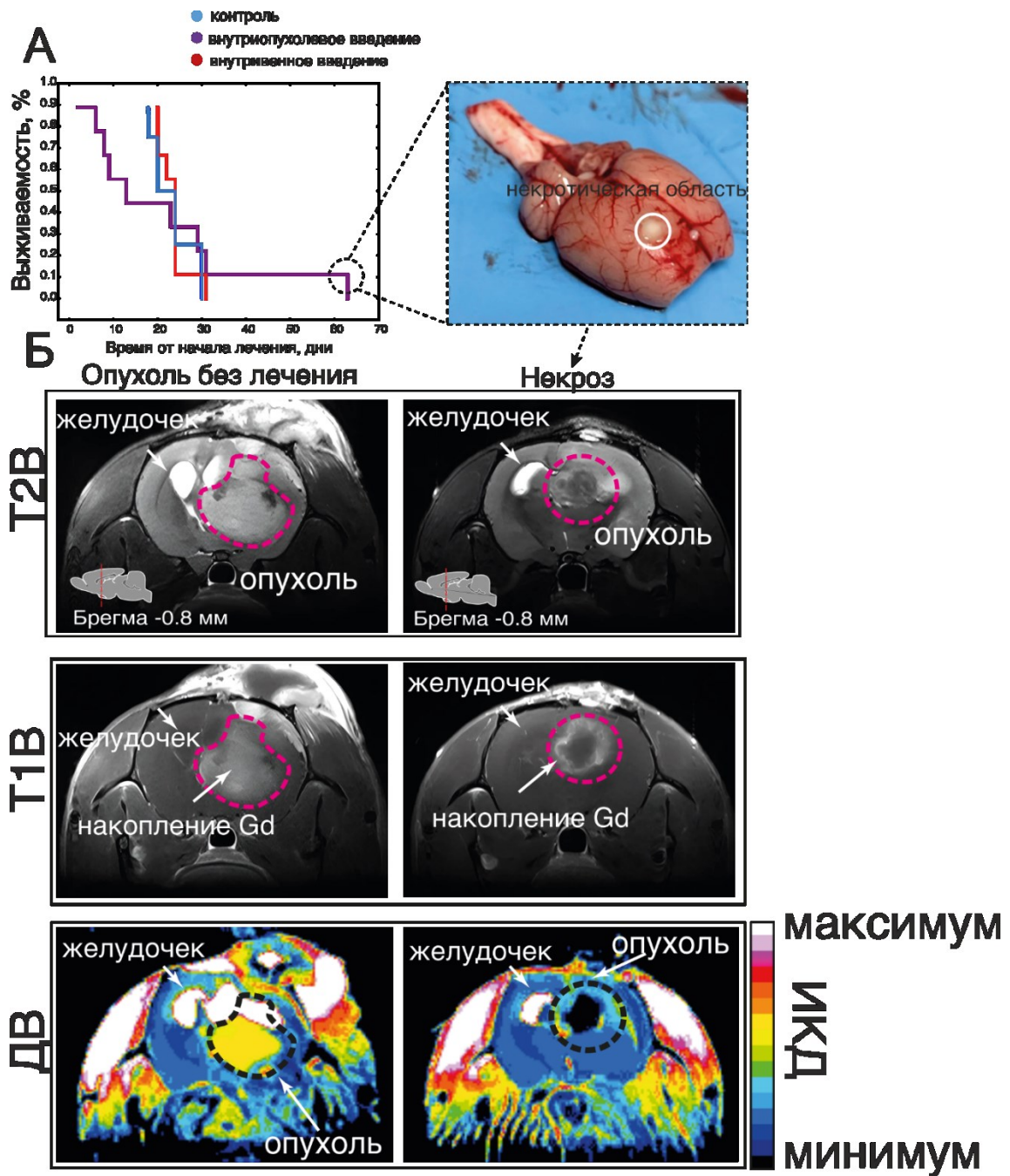


Рисунок 23. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы С6 крысы. А – выживаемость животных при внутривенном и внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact (метод Каплана-Мейера); Б – сравнительный анализ МРТ-изображений опухолей животного контрольной группы и животного с максимальной продолжительностью жизни (группа внутриопухолевого введения). Т1В – Т1-взвешенное изображение; Т2В – Т2-взвешенное изображение; ДВ – диффузионно-взвешенное изображение; ИКД – измеряемый коэффициент диффузии.

Согласно полученным данным, VV-GMCSF-Lact меняет характер развития опухоли. При внутриопухолевом введении вирусного препарата отсутствуют признаки инвазивного

роста глиобластомы, хотя объемы опухолей достоверно не отличались от объемов опухолей животных контрольной группы. Данный факт можно объяснить формированием отека в результате воспалительного процесса. Кроме того, при внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact обладает выраженным антипролиферативным действием по сравнению с внутривенным способом введения. Наличие побочных эффектов, ведущих к ранней гибели животных при внутриопухолевом введении, требует корректировки используемых доз препарата и терапевтической схемы его применения в дальнейших исследованиях. Например, перспективной представляется обработка резекционного поля вирусным препаратом непосредственно после хирургической резекции опухоли, что позволит уничтожить оставшиеся опухолевые клетки и минимизировать токсические эффекты. Комбинация VV-GMCSF-Lact с химио- или радиотерапией, либо с другими иммунотерапевтическими препаратами позволит значительно снизить эффективную дозу вируса.

В совокупности полученные данные свидетельствуют об эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении интракраниально трансплантированных опухолей С6 крысы. Однако для достижения более качественного ответа при монотерапии онколитическим вирусом необходимо корректировать дозу препарата, а также исследовать комбинированное действие совместно с другими применяемыми для терапии глиом лекарственными средствами.

### **3.6. Анализ совместного действия VV-GMCSF-Lact и химиопрепаратов в отношении глиом человека**

Основное лечение глиобластомы на сегодняшний день основано на комбинировании максимальной хирургической резекции, радио- и химиотерапии. Удаление опухоли позволяет снизить масс-эффект, а также получить ткань для последующего гистологического анализа и молекулярной характеристики [307]. Однако даже при максимальной хирургической резекции возникают рецидивы опухоли, поскольку клетки глиом способны мигрировать в отдаленные отделы мозга и образовывать экстракраниальные метастазы [52,308].

Мы показали, что онколитический вирус VV-GMCSF-Lact обладает цитотоксической активностью *in vitro* и противоопухолевой эффективностью *in vivo* в отношении глиобластомы человека. Предположительно, в дальнейших клинических испытаниях VV-GMCSF-Lact будет применяться для терапии глиом в комбинации с противоопухолевыми агентами, используемыми в настоящее время в клинической

практике. Таким образом, для разработки эффективных схем терапии опухолей головного мозга необходимо исследование совместного действия VV-GMCSF-Lact и применяемых в клинике химиопрепаратов.

### **3.6.1. Цитотоксическая активность химиопрепаратов в отношении клеток глиом человека**

Темозоломид (ТМЗ) представляет собой имидазотетразиновый алкилирующий агент второго поколения, который является основным препаратом в адъювантной терапии глиом [309]. Но опухолевые клетки способны приобретать устойчивость к действию алкилирующих агентов [310].

Другой химиотерапевтической схемой лечения глиомы является режим PCV. PCV представляет собой комбинацию прокарбазина (PCV), ломустина (CCNU) и винкристина (VCR) [59]. Однако эти препараты так же, как и ТМЗ, имеют серьезные токсические эффекты: прокарбазин может вызывать гранулематозный гепатит; ломустин и винкрестин обладают значительной гепатотоксичностью. Среди прочего наблюдаются различные типы невропатии и паралича глаз или голосовых связок [311–313].

Исследование чувствительности клеток глиом человека к используемым в клинике химиотерапевтическим препаратам (темозоломид, ломустин, прокарбазин и винкрестин) проводили с использованием линий глиобластомы U87 MG и U343 MG и полученных из образцов опухолей пациентов культур BR2.20 и BR5.21 глиом человека. Начальные концентрации препаратов для *in vitro* исследований были выбраны на основании литературных данных. Далее концентрации были скорректированы в соответствии с полученными нами первичными данными.

Согласно полученным данным (Таблица 7), клетки исследуемых культур обладают различной чувствительностью к действию химиопрепаратов. Все исследуемые культуры характеризуются устойчивостью к действию прокарбазина в диапазоне концентраций 0,09 мг/мл до 1 мг/мл. Клетки линии U343 MG являются самыми чувствительными к трем другим исследуемым химиопрепаратам – ломустину, винкрестину и темозоломиду. Наиболее устойчивыми к темозоломиду являются клетки линии U87 MG, к винкрестину и ломустину – клетки культуры BR5.21.

Показано, что клетки глиом обладают разной чувствительностью к действию наиболее распространенных химиотерапевтических препаратов, что еще раз подтверждает необходимость прецизионного подхода к лечению глиом, поскольку в разных опухолях пути, ответственные за резистентность к химиотерапии, могут быть различными.



Таблица 7. Чувствительность клеток глиом человека к действию химиотерапевтических препаратов.

	Культура	U87 MG	U343 MG	BR5.21	BR2.20
	Препарат				
CD50	Темозоломид, мкМ	437.3±2.1	25.3±0.9	297.2±1.3	408.2±2.4
	Винкристин, нМ	1±0.2	0.3±0.04	135.1±1.1	11.3±0.7
	Ломустин, нМ	21.4±1.4	17.5±0.7	86±2.2	n/a

CD50 – концентрация препарата, вызывающая гибель 50% клеток.

Поскольку в случае глиом основным применяемым в клинике противоопухолевым химиотерапевтическим агентом является темозоломид, а исследуемые культуры демонстрируют различный уровень чувствительности к этому препарату, именно ТМЗ был выбран для дальнейшей оценки совместного с онколитическим вирусом действия.

### 3.6.2. Совместное действие VV-GMCSF-Lact и темозоломида на клетки глиом человека *in vitro*

В ходе выполнения данной работы была проведена оценка цитотоксической активности онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении клеток иммортализованных линий глиобластомы человека U87 MG и U343 MG и клеток панели культур глиом человека, полученных из опухолей пациентов. Согласно полученным данным, клетки исследованных культур глиом обладают различной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact. Чувствительность клеток к вирусу убывает в ряду BR2.20>U343 MG>U87 MG>BR5.21.

Поскольку «золотым стандартом» первой линии лечения пациентов с глиобластомой является максимально возможное удаление опухоли с последующей комбинированной химиолучевой терапией с темозоломидом и дальнейшей адъювантной терапией темозоломидом, мы провели анализ действия онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в комбинации с темозоломидом в отношении клеток глиобластомы U87 MG и U343 MG и глиом BR2.20 и BR5.21, обладающих различной чувствительностью к VV-GMCSF-Lact. Клетки обрабатывали вирусным препаратом с множественностью инфекции, равной CD50 для каждой культуры (доза вируса (множественность инфекции), при которой погибает 50% клеток). Темозоломид добавляли к клеткам в различных концентрациях, индивидуальных для каждой культуры, через 24 часа от начала инкубации с вирусом. Схема



эксперимента представлена на Рисунке 24. Концентрации определяли исходя из чувствительности клеток конкретной культуры к препарату (Таблица 4). Для теста выбирали концентрации препарата меньше CD50, CD50 и больше CD50. Общее время инкубации клеток с препаратами составляло 72 ч при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток, обработанных препаратами, определяли относительно жизнеспособности контрольных необработанных клеток (100%)  $\pm$  SD по результатам трех независимых экспериментов.

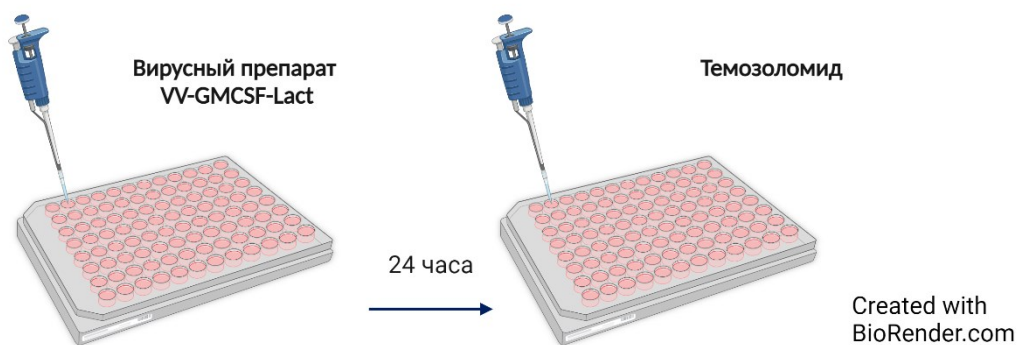


Рисунок 24. Схема комбинации «вирус-темозоломид» для обработки клеток глиом человека.

На основании полученных данных (Рисунок 25) можно сделать вывод, что наиболее устойчивая к VV-GMCSF-Lact культура BR5.21 при инкубации с вирусным препаратом и последующим добавлением темозоломида в различных концентрациях, выбранных как описано ранее, характеризуется большей чувствительностью к подобной комбинации (для максимальной концентрации темозоломида КИ (комбинационный индекс) =1, аддитивный эффект).

Остальные исследуемые культуры оказались устойчивы к комбинации вирус–темозоломид при добавлении химиопрепарата через 24 часа после вируса. Действие комбинации характеризуется антагонистическим эффектом. При этом, самой устойчивой к подобной комбинации культурой является глиобластома U87 MG (Рисунок 25).

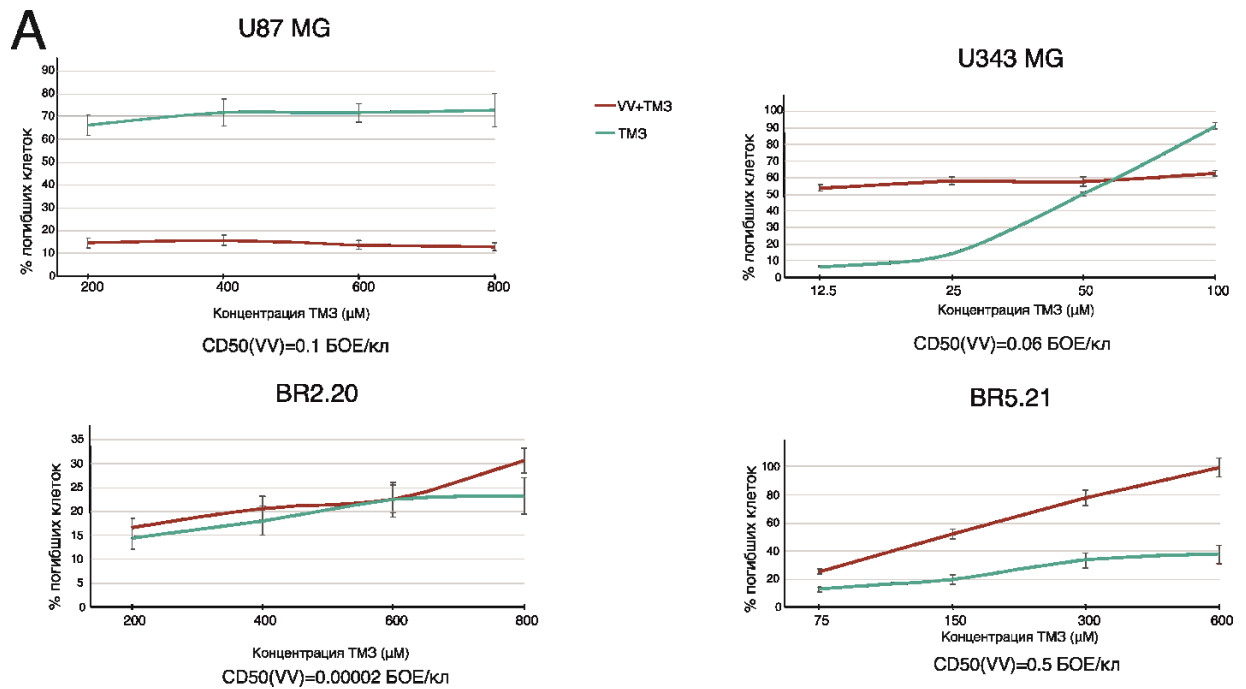
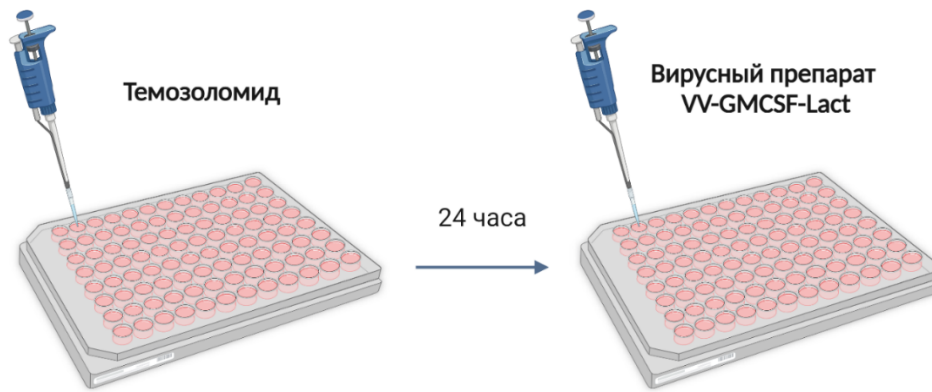


Рисунок 25. Изменение жизнеспособности клеток глиобластомы человека под действием комбинации VV-GMCSF-Lact - темозоломид. CD50(VV) – множественность инфекции, при которой погибает 50% клеток; VV – VV-GMCSF-Lact; TMZ – темозоломид. Представлены средние значения $\pm$ SD трех независимых экспериментов.

Кроме того, была проведена оценка действия вирусного препарата в комбинации с темозоломидом по иной схеме: клетки обрабатывали темозоломидом в различных концентрациях, индивидуальных для каждой культуры, через 24 часа от начала инкубации с темозоломидом к клеткам добавляли вирусный препарат в дозе, равной CD50 для каждой исследуемой культуры. Общее время инкубации клеток с препаратами составляло 72 ч при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Схема эксперимента представлена на рисунке 26. Совместное действие препаратов по данной схеме характеризуется антагонистическим эффектом для исследуемых культур (Рисунок 27). КИ составляет от 1 до 1.4 для самой высокой концентрации TMZ.



Created with  
BioRender.com

Рисунок 26. Схема комбинации «темозоломид-вирус» для обработки клеток глиом человека.

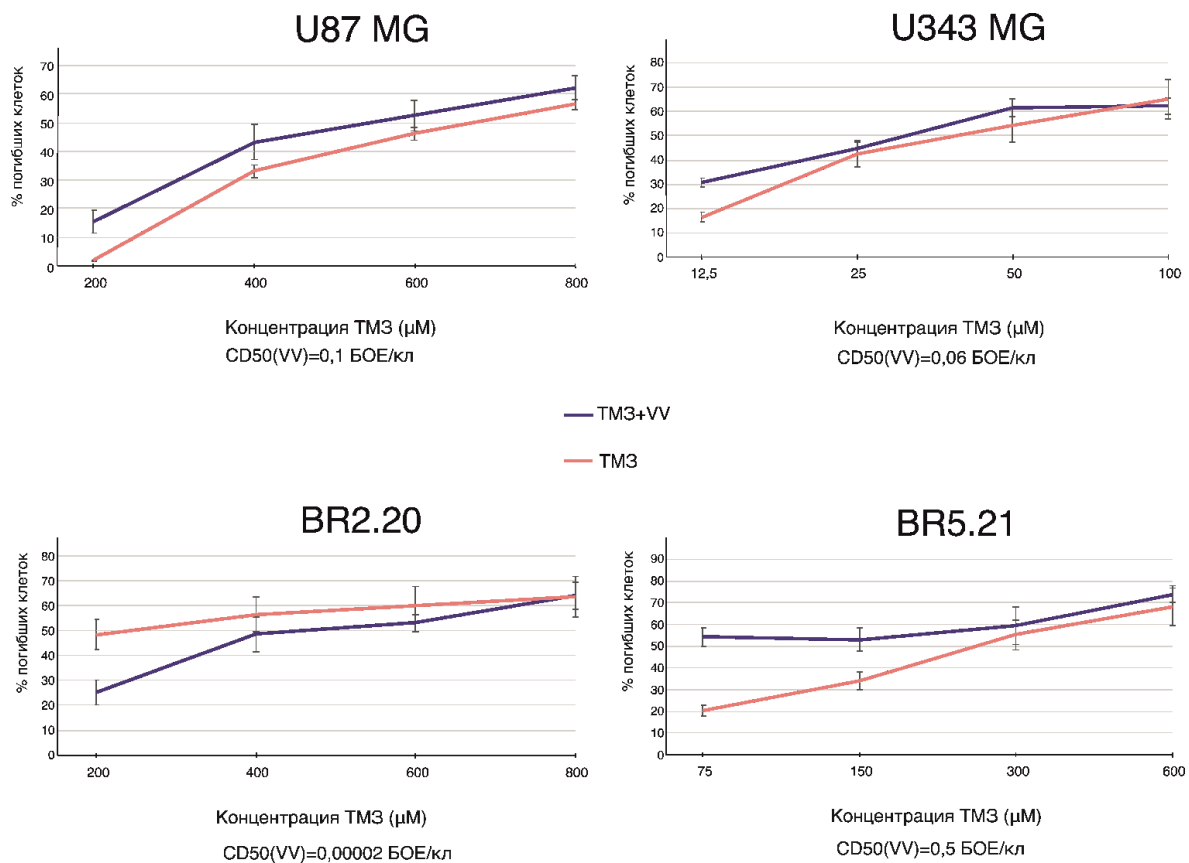


Рисунок 27. Изменение жизнеспособности клеток глиобластомы под действием комбинации темозоломид-VV-GMCSF-Lact. CD50(VV) – множественность инфекции, при которой погибает 50% клеток; VV – VV-GMCSF-Lact; ТМЗ– темозоломид. Представлены средние значения±SD трех независимых экспериментов.

Согласно полученным данным культура BR5.21, наиболее устойчивая к VV-GMCSF-Lact, характеризуется наибольшей чувствительностью к комбинации вирус-темозоломид. Клетки других культур проявляют устойчивость к комбинации препаратов при добавлении химиотерапевтического агента через 24 часа после воздействия вируса. Возможно, вирус и ТМЗ могут мешать действию друг друга, поэтому, одной из стратегий совместного применения данных препаратов может быть разнесение их по времени. Существуют различные механизмы устойчивости глиальных клеток к темозоломиду, некоторые из этих механизмов могут быть опосредованы репликацией вируса в клетках. Например, известно, что ТМЗ, кроме своего алкилирующего действия, индуцирует р53-зависимый апоптоз [314]. В то же время белок вируса осповакцины В1 фосфорилирует р53, опосредуя его деградацию [244]. Белок В12 того же вируса также способен взаимодействовать с р53 и р21, тем самым препятствуя остановке клеточного цикла и индукции апоптотических каскадов [245,246]. С другой стороны, при вирусной инфекции может изменяться работа некоторых клеточных молекул, тем самым обуславливая такие эффекты, как возникновение антагонистического действия комбинации вируса с темозоломидом. Например, показано, что на ранних стадиях инфекции вирус осповакцины способствует активации цитоплазматической ATR киназы (Атаксия-телеангиэктазия и Rad3 зависимая киназа) [246], которая является одной из ключевых молекул в индукции репарации ДНК [315]. При этом, в клетках глиом при терапии темозоломидом важную роль в устойчивости к химиопрепарату играет путь MMR. Комплексы MutSa и MutLa локализуются в области формирования неканоничных пар ОбМеГ:Т и рекрутируют ATR [316]. Вследствие этого происходит либо репарация ДНК, либо гибель клетки, если нарушения не могут быть устранены. Таким образом, вирус осповакцины может усиливать развитие механизмов устойчивости клеток глиом к темозоломиду.

Кроме того, мы показали, что комбинированное действие препаратов по схеме темозоломид-вирус оказывает антагонистический эффект на исследуемые клетки. Данное наблюдение может быть связано с алкилирующим действием ТМЗ, что может приводить к снижению эффективности репликации вируса. Кроме того, снижение эффективности комбинированного действия вируса и ТМЗ может зависеть от индивидуальных биологических особенностей клеток определенной опухоли.

Таким образом, клетки глиом человека обладают устойчивостью к действию комбинации VV-GMCSF-Lact и ТМЗ при выбранных схемах. Другие исследователи в своих работах сообщают о синергическом эффекте виротерапии и химиотерапии ТМЗ [151–153]. В исследованиях вируса простого герпеса G47Δ в сочетании с ТМЗ показана высокая эффективность *in vitro* [153], но не *in vivo* [154]. Однако данных о комбинированном

действии вируса осповакцины и алкилирующих агентов в отношении опухолей головного мозга найти не удалось.

### 3.6.3. Оценка комбинации VV-GMCSF-Lact и темозоломида *in vivo*

Изучение комбинированного действия препаратов для лечения опухолей на моделях *in vitro* очень важно, так как позволяет скорректировать схему терапии в дальнейших доклинических и клинических исследованиях лекарственных средств. Поскольку золотым стандартом терапии глиомы, как уже было отмечено выше, является максимальная хирургическая резекция с последующей лучевой терапией и/или химиотерапией, целесообразно было оценить эффект VV-GMCSF-Lact в комбинации с наиболее распространенным химиопрепаратом — темозоломидом. Полученные нами данные позволили предложить схему использования комбинации VV-GMCSF-Lact-TMЗ в *in vivo* экспериментах. Терапевтическая схема должна учитывать в первую очередь специфику взаимодействия препаратов, составляющих комбинацию. Также при разработке схемы следует учитывать особенности фармакокинетики онколитического вируса при введении в организм. Из литературных данных и данных наших доклинических исследований известно, что фармакокинетика вируса является нелинейной, и выявляется два пика вируса в крови - 5-30 минут и 5-7-й день после введения [297,317]. Это связано со способностью вируса размножаться в опухолевых клетках и «поставлять» зрелые вирусные частицы в кровотоки. Следовательно, введение темозоломида в терапевтическую схему должно происходить не ранее чем через 8-9 дней после VV-GMCSF-Lact для снижения рисков угнетения эффективности химиотерапевтического или вирусного агента. В экспериментах *in vitro* мы показали, что клетки глиобластомы U87 MG устойчивы к комбинации вируса и TMЗ. Таким образом, данная модель представляет большой интерес для оценки релевантности разработанных схем комбинированного действия препаратов *in vivo* (Рисунок 29).

Для оценки противоопухолевой эффективности комбинации VV-GMCSF-Lact и TMЗ мышам линии SCID подкожно трансплантировали клетки U87 MG ( $3 \times 10^6$  клеток на мышь). При достижении объемов опухолей 100–120 мм<sup>3</sup> животных разделили на группы и проводили терапию согласно схеме, указанной на Рисунке 28.

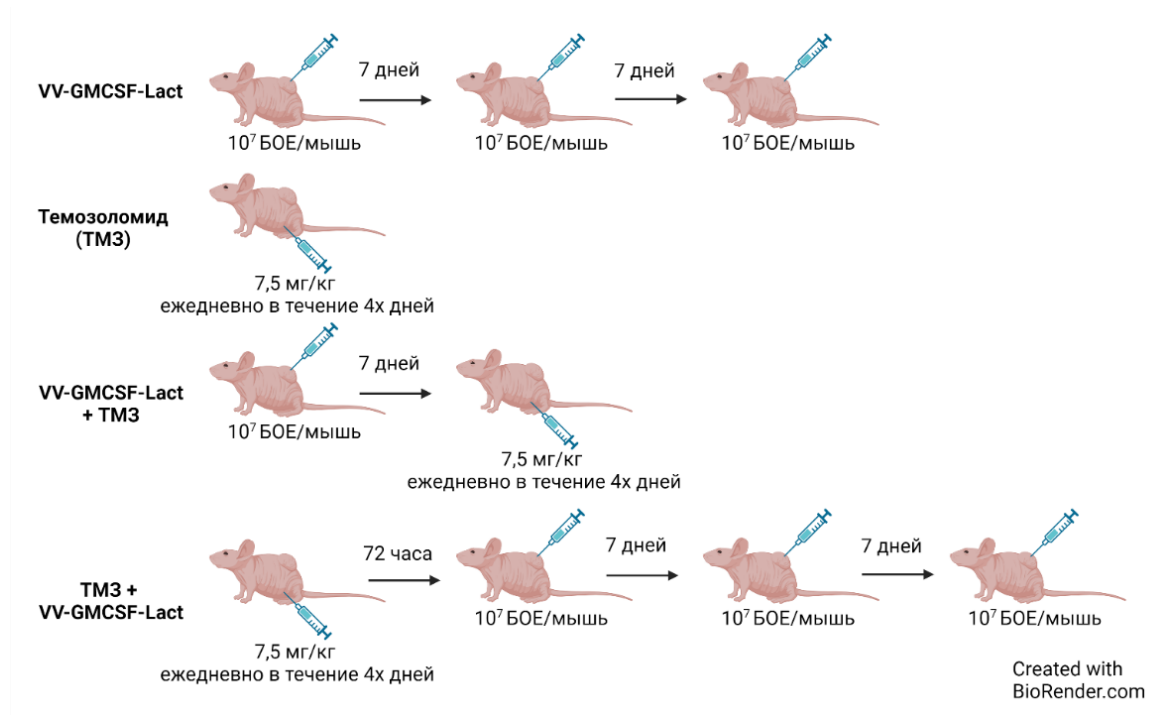


Рисунок 28. Схема лечения мышей SCID с подкожно трансплантированными опухолями U87 MG VV-GMCSF-Lact и TM3 как в режиме монотерапии, так комбинацией препаратов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что VV-GMCSF-Lact как в режиме монотерапии, так и в комбинации с TM3, независимо от порядка применения препаратов, обладает высокой противоопухолевой эффективностью (Рисунок 29). Так, достоверные отличия объемов опухолей групп «VV-GMCSF-Lact», «VV-GMCSF-Lact+TM3» и «TM3+VV-GMCSF-Lact» по сравнению с контрольной группой показаны уже на 23 день с момента начала лечения ( $p \leq 0.01$ ). При этом, достоверные различия в объемах опухолей контрольной группы и группы, получавшей инъекции TM3, показаны лишь к 32 дню от начала лечения. Объемы опухолей в группах «VV-GMCSF-Lact», «VV-GMCSF-Lact+TM3» и «TM3+VV-GMCSF-Lact» достоверно меньше, чем в группе TM3, начиная с 32 дня эксперимента, к моменту окончания эксперимента  $p \leq 0.001$ .

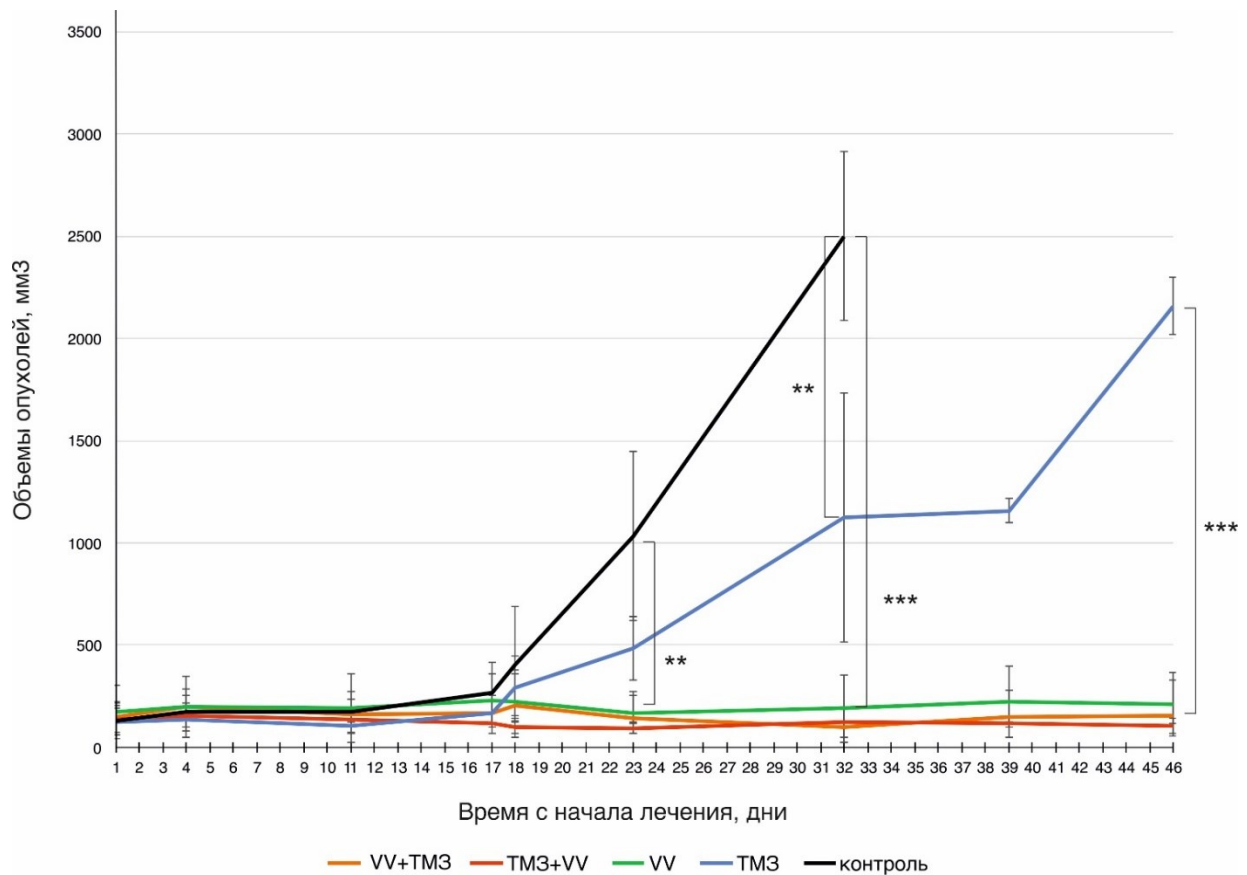


Рисунок 29. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact, темозоломида и их комбинации в отношении подкожно трансплантированной глиобластомы U87 MG. Данные представлена как среднее значение  $\pm$  SD (n=6). \*\* -  $p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p \leq 0.001$ . Статистический анализ данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Индексы торможения роста опухолей (ТРО) для групп «VV-GMCSF-Lact», «VV-GMCSF-Lact+TM3» и «TM3+VV-GMCSF-Lact» достоверно не отличаются, что свидетельствует о том, что все исследованные схемы терапии возможны к применению. При этом, при применении TM3 в режиме монотерапии индекс ТРО составил лишь 33% (Таблица 8).

Таблица 8. Индексы ТРО при терапии подкожно трансплантированной глиобластомы U87 MG вирусом VV-GMCSF-Lact, темозоломидом или их комбинацией.

Группа	ТРО, %
VV-GMCSF-Lact	93
TM3+VV-GMCSF-Lact	96
VV-GMCSF-Lact+TM3	93
TM3	33

ТРО – индекс торможения роста опухоли.

При визуальном осмотре животных были выявлены дополнительные опухолевые узлы у всех животных во всех группах, кроме животных, получавших только ТМЗ внутрибрюшинно. Вероятно, образование дополнительных опухолевых узлов после проведения терапии происходит вследствие внутриопухолевых инъекций, поскольку известно, что основной причиной возникновения метастазов глиом являются оперативные вмешательства и иные манипуляции [318].

Исследование особенностей противоопухолевой активности темозоломида, вирусного препарата и их комбинации проводили путем гистологической оценки структурной организации опухолевых узлов глиобластомы U87 MG без лечения и после введения темозоломида (ТМЗ), вирусного препарата (VV-GMCSF-Lact, далее VV) и их комбинации. (Рисунок 30). Оценку митотической активности в ткани опухоли проводили путем подсчета численной плотности ( $N_v$ ) митозов в единице тестовой площади. Оценку степени деструктивных изменений в опухолевом узле проводили путем подсчета площади среза, занимаемой опухолевой тканью в состоянии некротического распада, в том числе инфильтрированного гранулоцитами, по отношению ко всей площади среза опухолевого узла. При морфометрическом исследовании оценивали от 5 до 15 полей зрения в зависимости от состояния опухолевого узла и степени его деструкции (Таблица 9). Гистологический анализ опухолей U87 MG после терапии мышей SCID с помощью VV-GMCSF-Lact и темозоломида выполнен к.м.н., с.н.с. лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Сеньковой А.В. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).



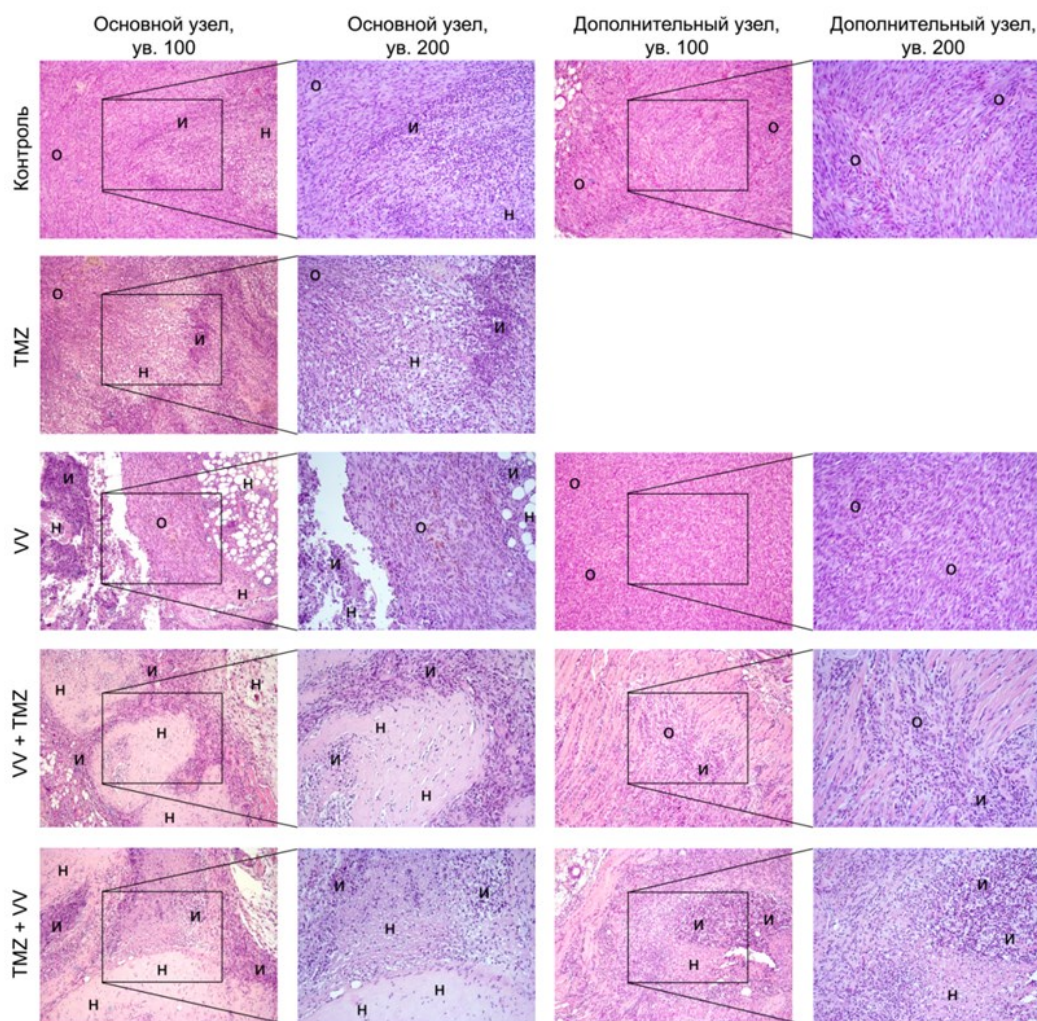


Рисунок 30. Структурные изменения опухоли глиобластомы U-87, подкожно трансплантированной мышам линии SCID, без лечения (контроль) и после введения темозоломида или онколитического вируса, а также при комбинированной терапии (VV+TMZ и TMZ+VV). Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100$  и  $\times 200$ . О – неизменная опухолевая ткань, Н – очаги некроза, И – участки инфильтрации гранулоцитами.

Таблица 9. Структурные изменения в ткани глиобластомы U-87 без лечения и после введения темозоломида, вирусного препарата и их комбинации.

	Контроль	TMZ	VV	VV + TMZ	TMZ + VV
Митозы, Nv	$5,5 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,4^{**}$	0	0
Деструктивные изменения, %	$52,1 \pm 9,5$	$62,5 \pm 12$	$74,5 \pm 9,8$	$93,6 \pm 3,6^*$	$66,8 \pm 2,5$

\* отличия статистически значимы от контроля при  $p \leq 0.05$ . \*\* отличия статистически значимы от контроля при  $p \leq 0.001$ .

Основной опухолевый узел в контрольной группе имеет округлую форму с четкими границами и представлен веретенообразными клетками с тонким ободком цитоплазмы и гиперхромными ядрами. Ткань опухоли содержат большое количество деформированных сосудов с тонкими стенками и умеренное количество митозов ( $5.5 \pm 0.7$  в поле зрения). В центре опухолевого узла определяется очаг некроза, занимающий  $52.1 \pm 9.5\%$  от всей площади среза, формирование которого может быть связано с недостаточным кровоснабжением опухоли новообразованными сосудами с несовершенной структурой. На границе между некрозом и неизменной опухолевой тканью определяется скопление большого числа гранулоцитов, имеющее реактивную природу. Дополнительный опухолевый узел имеет сходное морфологическое строение, однако из-за небольшого размера не содержит очагов некроза и клеточной инфильтрации.

При внутрибрюшинном введении темозоломида в опухолевом узле наблюдались выраженные деструктивные изменения, представленные массивными очагами некроза, обильно инфильтрированными гранулоцитами и составляющими  $62.5 \pm 12\%$  от площади среза. Также было выявлено снижение пролиферативной активности опухоли: численная плотность митозов составила  $3.6 \pm 0.6$  на единицу тестовой площади.

Внутриопухолевое введение онколитического вируса также вызывало развитие деструктивных изменений в опухолевом узле, которые имели некоторые морфологические особенности: массивные очаги некроза содержали большое количество кистозных структур, формирование которых может быть связано с гибелью опухолевых клеток и деструкцией внеклеточного матрикса под действием вируса. Также отдельно определялся очаг некроза, полностью инфильтрированный гранулоцитами. Некротические изменения в ткани опухоли занимали  $74.5 \pm 9.8\%$ . При подсчете митозов было выявлено значительное снижение их численной плотности: в 9.2 раза по сравнению с контролем. Дополнительный опухолевый узел, обнаруженный у мыши и в который не производились инъекции вируса, имел морфологическую структуру, сходную со структурой опухолевых узлов животных из контрольной группы, в которых отсутствовали очаги распада и инфильтрации гранулоцитами.

Проведение комбинированной терапии онколитическим вирусом с последующим введением темозоломида вызывало массивную клеточную миграцию в ткань опухоли. При гистологическом исследовании опухолевых узлов были выявлены очаги бесструктурной некротически измененной ткани, инфильтрированной гранулоцитами и разделенной прослойками опухолевых клеток, которые также были диффузно инфильтрированы гранулоцитами. Очаги деструкции в данном случае занимали  $93.6 \pm 3.6\%$  от всей площади среза. Дополнительный опухолевый узел был представлен скоплением опухолевых клеток,

не формирующим четко выраженного опухолевого узла, с примесью гранулоцитов. Вокруг опухолевых клеток наблюдаются мышечные волокна.

При комбинированной терапии темозоломидом с последующим введением онколитического вируса опухолевый узел практически полностью был представлен очагами некротического распада, обильно инфильтрированного гранулоцитами, по периферии которого были обнаружены лишь остатки опухолевой ткани. Однако при морфометрическом исследовании степень деструкции была несколько менее выражена, чем в предыдущей группе: очаги некроза занимали  $66.8 \pm 2.5\%$  от площади среза. Дополнительный опухолевый узел также был представлен преимущественно тканью в состоянии некротического распада, инфильтрированного гранулоцитами, по периферии определялся ободок из опухолевых клеток.

При обеих схемах комбинированного лечения фигур митоза в ткани опухоли обнаружено не было.

Согласно полученным данным, можно сделать вывод, что терапия глиобластомы вирусным препаратом VV-GMCSF-Lact как в режиме монотерапии, так и в комбинации с ТМЗ, значительно эффективнее, чем терапия только ТМЗ. Несмотря на то, что достоверных отличий индексов ТПО между группами «VV-GMCSF-Lact», «VV-GMCSF-Lact+ТМЗ» и «ТМЗ+VV-GMCSF-Lact» не обнаружено, данные гистологического анализа свидетельствуют о том, что комбинированная терапия по схеме «вирус-темозоломид» характеризуется более значимым противоопухолевым эффектом, поскольку применение VV-GMCSF-Lact до ТМЗ приводит к большей степени деструкции опухолевой ткани.

Таким образом, учитывая данные анализа *in vitro* и *in vivo*, введение ТМЗ в схему лечения следует проводить после обработки поля резекции препаратом VV-GMCSF-Lact. В этом случае цитотоксическое действие препаратов будет направлено только на оставшиеся после резекции опухолевые клетки, что существенно уменьшит вероятные побочные эффекты воспалительного процесса в результате виро-терапии. С другой стороны, такая комбинация позволит снизить дозу ТМЗ на последующем курсе. В конечном итоге это не только снизит риск рецидива, но и улучшит качество жизни пациентов.

### **3.7. Исследование механизмов, обуславливающих чувствительность клеток глиом человека к действию VV-GMCSF-Lact**

Одной из основных проблем эффективного лечения глиом является резистентность опухоли к существующим терапевтическим подходам. Известно, что глиомы характеризуются межопухолевой и внутриопухолевой гетерогенностью. Некоторые молекулярные подтипы глиом, например, пронеуральный, более чувствительны к

радиотерапии и химиотерапии темозоломидом, однако определенные типы этого новообразования, в частности мезенхимальный молекулярный подтип, устойчивы к стандартной терапии [194,319].

В настоящее время одним из наиболее активно развивающихся терапевтических подходов является иммунотерапия, в частности, онколитическая виротерапия [6]. При этом вопрос о формировании резистентности опухолевых клеток к вирусной терапии остается открытым [12,13].

В своих исследованиях мы показали, что клетки различных культур глиом, как иммортализованных, так и полученных из образцов опухолей пациентов, обладают разной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact. Чувствительность исследуемых клеток к виротерапии может определяться различными процессами, вовлеченными в инфицирование клетки: проникновение вирусных частиц в клетку, активация сигнальных каскадов, способствующих эффективной репликации вируса, а также активация путей клеточной гибели. Исследование данных процессов позволит подобрать оптимальные схемы виротерапии глиом для достижения максимальной противоопухолевой эффективности.

### **3.7.1. Оценка уровня белков, опосредующих проникновение VV-GMCSF-Lact в клетки глиом человека**

Вирус осповакцины способен проникать в клетку-хозяина как посредством прямого слияния мембран и pH-зависимого эндоцитоза, так и по механизму макропиноцитоза за счет взаимодействия остатков фосфатидилсерина на вирусной мембране с рецепторами, ассоциированными с G-белком клетки, что приводит к активации нижележащих сигнальных путей, таких как PI3K/Akt, реорганизации цитоскелета клетки-хозяина и последующему проникновению вируса внутрь клетки. Показано, что ингибирование PI3K приводит к снижению количества проникших в клетку вирионов [227]. Кроме того, на всех стадиях макропиноцитоза задействована p21-активированная киназа PAK1, перемещение которой на плазматическую мембрану приводит к активации множества эффекторов, необходимых для образования макропиносом [226].

Оценку уровня белков, способных опосредовать проникновение VV-GMCSF-Lact в клетку, проводили на разных клеточных моделях глиом человека: клетках иммортализованных линий и клетках культур, полученных из образцов опухолей пациентов.

В первую очередь методом Вестерн-блот анализа была проведена оценка уровня белков p85 и p110 $\alpha$  (регуляторная и каталитическая субъединицы PI3K, соответственно),

pAkt1<sup>Ser-473</sup>, pAkt1<sup>Thr-308</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> в клетках immortalized линий глиобластомы человека U87 MG и U343 MG, имеющих разную чувствительность к вирусу. CD50 (множественность инфекции, при которой погибает 50% клеток) для клеток U87 MG составляет 0.1 БОЕ/клетку, а для клеток U343 MG – 0.06 БОЕ/клетку. Для оценки уровня данных белков были получены лизаты клеток до и после воздействия вирусного препарата (через 30 минут, 60 минут, 2 часа, 6 часов и 12 часов). Множественность инфекции составляла 1 БОЕ/клетку.

Исследование уровня белков p85α и p110α, регуляторной и каталитической субъединиц PI3K, показало, что в клетках U343 MG, более чувствительных к действию VV-GMCSF-Lact, относительный уровень исследуемых белков во всех временных точках выше, чем в клетках U87 MG (Рисунок 31). При этом в клетках U87 MG уровень p110α достоверно возрастает к 2 часам с момента начала инкубации с вирусом.

Более высокий уровень p85α и p110α в клетках U343 MG, вероятно, обуславливает образование большего количества гетеродимеров PI3K и, соответственно, активацию сигнального каскада PI3K/Akt, элементы которого, согласно литературным данным, участвуют не только в проникновении вируса осповакцины в клетку, но и необходимы на ранних стадиях репликации вируса [320].

Кроме того, наиболее чувствительные к вирусу клетки U343 MG характеризуются более высоким уровнем pAkt1<sup>Ser-473</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> (аутофосфорилирование PAK1 по данным сайтам предотвращает возврат киназы в неактивную конформацию [321]) (Рисунок 32). При этом, с увеличением времени инкубации с вирусом клеток обеих линий уровни данных белков возрастали по сравнению с контрольными клетками. В клетках U343 MG уровень pPAK1<sup>Ser199/204</sup> достоверно увеличивается уже к 30 минутам инкубации с вирусом, а в более устойчивых к вирусу U87 MG – лишь к 12 часам. Показано, что PAK1 участвует в реорганизации цитоскелета и динамике микротрубочек, опосредуя блеббинг клеточной мембраны [322], а ингибирование этого фермента снижает эффективность инфицирования клеток вирусом осповакцины [227].

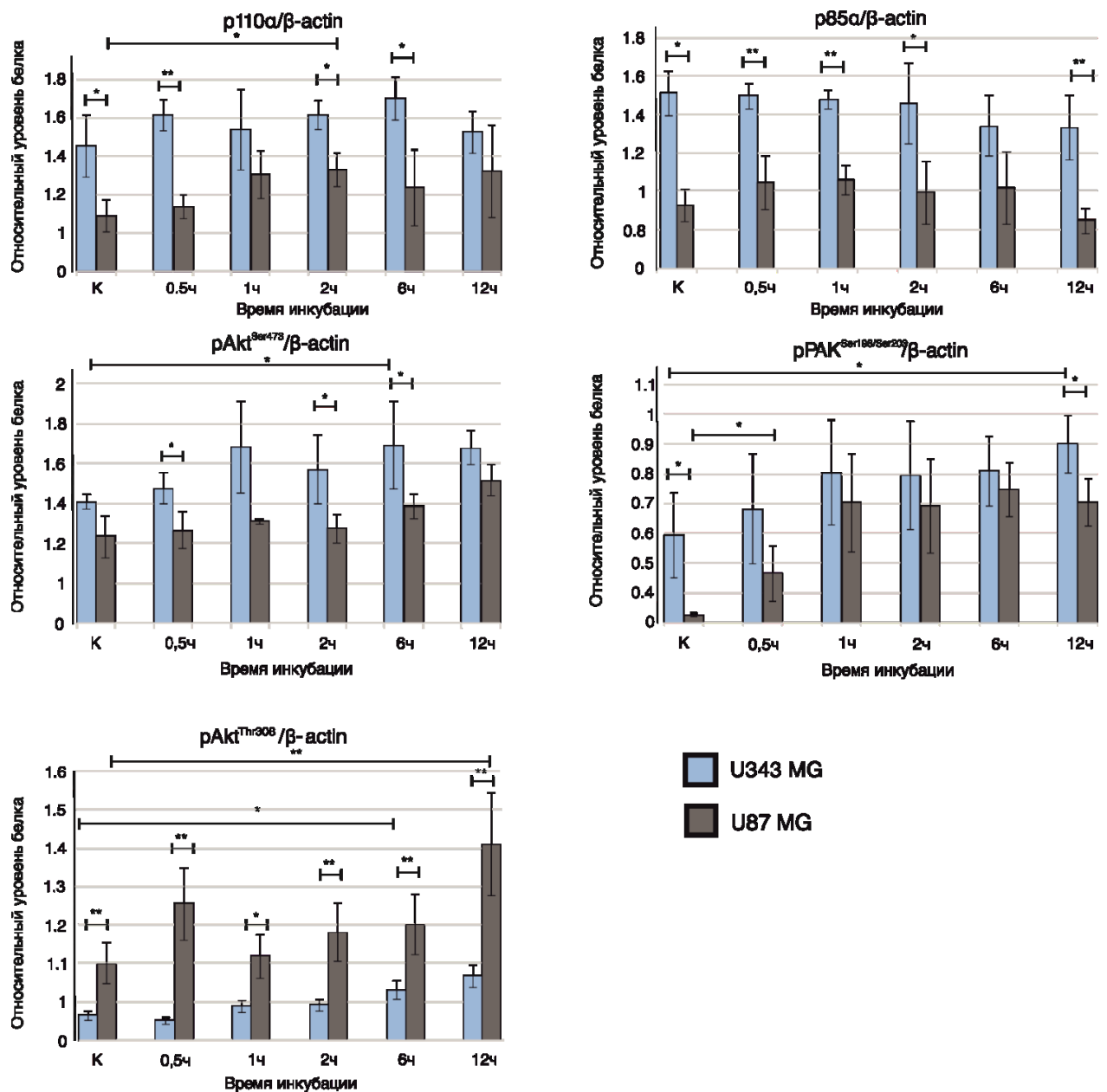


Рисунок 31. Относительные уровни белков p85α и p110α, pAktSer<sup>473</sup>, pAkt<sup>Thr-308</sup> и pPAK1Ser<sup>199/204</sup> в клетках иммортализованных культур U87 MG и U343 MG до и после инкубации с VV-GMCSF-Lact (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). Денситометрический анализ проведен с использованием программного обеспечения Gel-Pro Analyzer 3.1. Представлены средние значения±SD трех независимых экспериментов, нормализацию проводили относительно уровня β-актина. Статистическая обработка выполнена с использованием t-критерия Стьюдента.

Фосфорилирование Akt1 по серину в 473 положении осуществляется комплексом mTORC2 [323]. Известно, что консервативный белок поксвирусов F17, секвестируя Raptor и Rictor, нарушает регуляцию mTOR, что ведёт к сверхактивации комплекса mTORC2 [324]. Таким образом, можно предположить, что более высокий уровень pAkt1<sup>Ser-473</sup> в

чувствительных к VV-GMCSF-Lact клетках U343 MG свидетельствует о более эффективном проникновении вируса в клетки, опосредованном PI3K и PAK1.

Однако стоит отметить, что фосфорилирование Akt1 по треонину в 308 положении оказывает более выраженный эффект на полную активацию этой киназы [325]. При взаимодействии остатков фосфатидилсерина на вирусной мембране с рецепторами, ассоциированными с G-белком клетки-хозяина, формируются гетеродимеры p85-p110 (PI3K), впоследствии PI3K превращает фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат (PIP2) в фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат (PIP3). После связывания плекстрин-подобного домена Akt1 с PIP3, Akt1 фосфорилируется по Thr308 киназой PDK1 [326,327]. Уровень фосфорилированной в этом положении Akt был выше в клетках U87 MG, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lac, как в контрольной точке, так и со временем инкубации с вирусом, что может свидетельствовать о более высоком уровне полностью активированной Akt1 в данных клетках. Кроме того, уровень данного белка возрастает со временем инкубации с вирусом клеток обеих линий по сравнению с контрольными клетками. Фосфорилированная по обоим сайтам Akt1 активирует комплекс mTORC1 как косвенно, через инактивацию TSC2 (туберин, белок кодируемый геном комплекса туберозного склероза 2), так и напрямую, посредством фосфорилирования PRAS40 (богатый пролином субстрат Akt1 40 кДа) [328].

Описанные процессы приводят к увеличению синтеза белка и блокированию системы апоптоза. Показано, что Akt регулирует апоптотические процессы, ингибируя каспазы 9 и 3 [329]. При этом лактапин, экспрессируемый VV-GMCSF-Lact, индуцирует апоптотическую гибель клеток по митохондриальному пути. Показано, что при инкубации клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с RL2 уровень активной каспазы-9 в клетках увеличивается [123]. Таким образом, устойчивость клеток глиобластомы U87 MG к действию VV-GMCSF-Lact может быть обусловлена активностью киназы Akt, которая ингибирует апоптоз, индуцируемый лактапином.

Оценку уровня белков, опосредующих эффективность проникновения онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в клетки культур, полученных из образцов опухолей пациентов, проводили также в клетках BR1.20 и BR3.20 с различной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact. CD50 (множественность инфекции, при которой погибает 50% клеток) для клеток культуры BR1.20 составляет 0.006 БОЕ/клетку, а для клеток культуры BR3.20 – 0.02 БОЕ/кл.

Согласно полученным данным, уровни белков p85α и p110α в клетках BR1.20 и BR3.20 изменялись в зависимости от времени инкубации с вирусом (Рисунок 32). В клетках BR1.20 уровень p85α достоверно повышался к 12 часам инкубации относительно

контрольных клеток, в клетках BR3.20 – незначительно повышался к 6 часам инкубации и затем снижался к 12 часам. Уровень p110 $\alpha$  в клетках BR1.20 в среднем оставался на одном уровне в течение 12 часов инкубации, а в клетках BR3.20 – снижался к 12 часам. Уровень PAK1 в более чувствительных клетках BR1.20 повышался к 30 минутам инкубации с вирусом, затем снижался к 60 минутам и снова возрастал к 12 часам. В то же время в клетках BR3.20 уровень PAK1 снижался к 60 минутам инкубации с VV-GMCSF-Lact, возрастал к 2 часам и снова снижался к 12 часам. Количество pAkt1<sup>Ser-473</sup> в клетках обеих культур возрастало к 60 минутам инкубации, снижалось к 2 часам и снова возрастало к 12 часам. Уровень pAkt<sup>Thr-308</sup>, напротив, снижался к 60 минутам, повышался к 2 часам и снова снижался к 12 часам инкубации в клетках обеих культур (Рисунок 32). Однако к 2 и 12 часам инкубации с VV-GMCSF-Lact уровень pAkt1<sup>Thr-308</sup> был значительно выше в более устойчивых к действию вируса клетках BR3.20. Таким образом, исследование уровня описанных белков показало, что уровни p85 $\alpha$  и p110 $\alpha$  (регуляторная и каталитическая субъединицы PI3K, соответственно), pAkt1<sup>Ser-473</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> изменяются со временем инкубации, но при этом значительно не различаются в клетках BR1.20 и BR3.20. Однако, важно отметить, что уровень pAkt1<sup>Thr-308</sup> в клетках BR3.20, более устойчивых к действию вируса, был выше и достоверно отличался от уровня pAkt1<sup>Thr-308</sup> в клетках BR1.20 к 2 и 12 часам инкубации с вирусом.



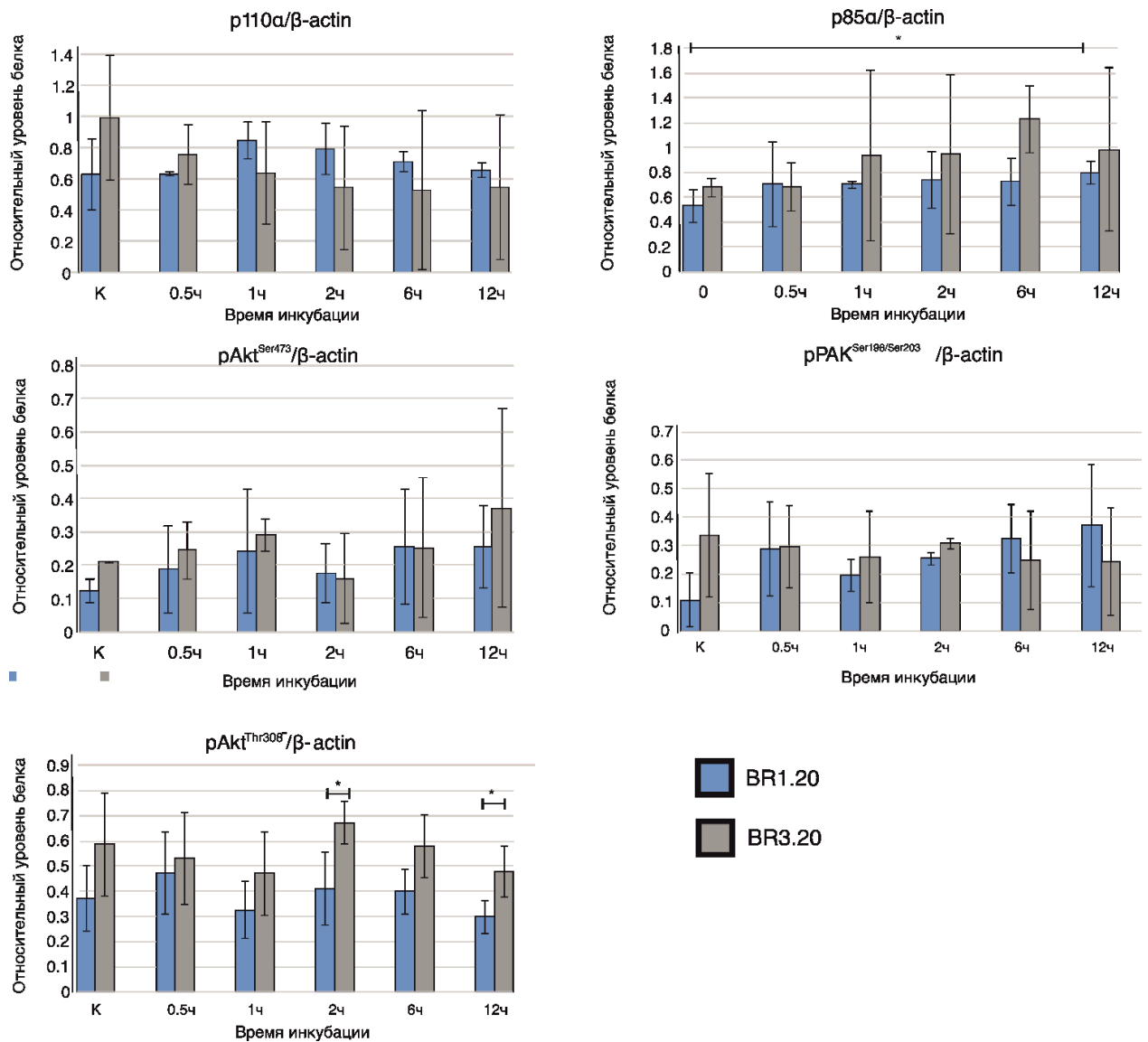


Рисунок 32. Относительные уровни белков p85α и p110α, pAkt1<sup>Ser-473</sup>, pAkt1<sup>Thr-308</sup> и pPAK1<sup>Ser199/204</sup> в клетках культур BR1.20 и BR3.20 до и после инкубации с VV-GMCSF-Lact (\*p<0/05). Денситометрический анализ проведен с использованием программного обеспечения Gel-Pro Analyzer 3.1. Представлены средние значения±SD трех независимых экспериментов, нормализацию проводили относительно уровня β-актина. Статистическая обработка выполнена с использованием t-критерия Стьюдента.

Мы показали, что как для иммortalизованных линий, так и для полученных из образцов опухолей пациентов культур глиом, в более устойчивых к действию вируса клетках выше уровень именно pAkt1<sup>Thr-308</sup>. Более того, уровень pAkt1<sup>Thr-308</sup> положительно коррелирует с чувствительностью клеток к действию вируса (Рисунок 33).

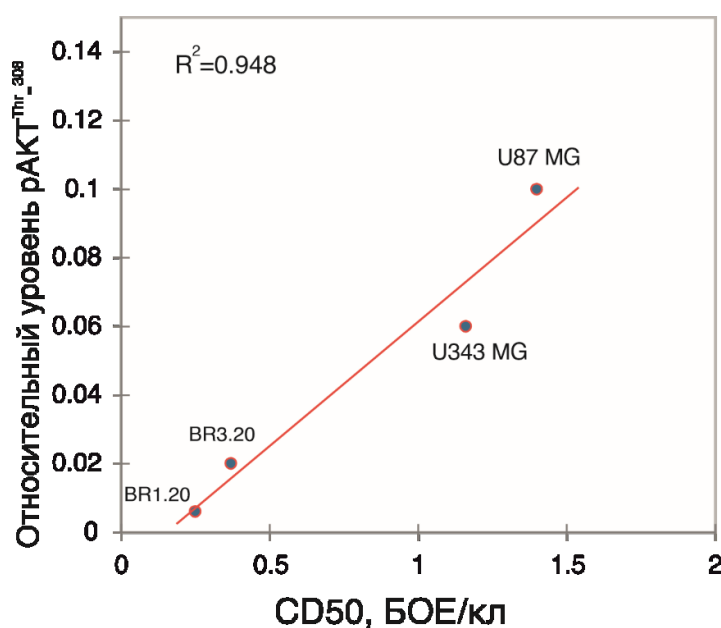


Рисунок 33. Корреляция между относительным уровнем белка pAkt<sup>Thr-308</sup> в клетках глиом и их чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact (CD50). Нормализация pAkt<sup>Thr-308</sup> выполнена относительно уровня  $\beta$ -актина.

При этом, молекулярные механизмы, регулирующие активацию киназ PI3K и PAK1 и последующее проникновение вируса в опухолевые клетки, могут значительно различаться в клетках разных культур глиом. В процессы, опосредующие эффективность проникновения вируса осповакцины в клетку, могут быть вовлечены и другие молекулярные события. Например, показано, что клетки глиобластомы часто характеризуются делециями или мутациями в гене опухолевого супрессора PTEN, который в свою очередь ингибирует активацию Akt1 [330,331]. Также было показано, что в клетках глиобластомы высоко экспрессируется киназа PDK1, которая может активировать PAK1 и вовлечена в процессы реорганизации цитоскелета [332–334].

Эффективное проникновение VV-GMCSF-Lact в клетки глиобластомы не означает эффективное онколитическое действие вируса, поскольку для достижения цитотоксического эффекта проникший в клетку вирус должен успешно реплицироваться. VV-GMCSF-Lact несёт делеции в генах вирусной тимидинкиназы и ростового фактора, что не позволяет ему реплицироваться в здоровых, нормально делящихся клетках. Однако опухолевые клетки также могут иметь различный уровень ростовых факторов и других белков, необходимых для репликации вирусной ДНК и последующей сборки новых вирусных частиц, что будет определять противоопухолевую эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении разных опухолей.

Таким образом, на основании полученных данных, мы можем заключить, что в клетках глиом человека, устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, детектируется более высокий уровень активированной киназы Akt1, которая ингибирует митохондриальный путь апоптоза, что вероятно снижает эффективность цитотоксического действия рекомбинантного вируса, экспрессирующего трансген лактаптин – индуктор апоптоза по митохондриальному пути. При этом, уровни белков, отвечающих за эффективность проникновения вируса в клетку-хозяина.

### **3.7.2. Анализ апоптотических процессов в клетках глиобластомы человека под действием VV-GMCSF-Lact**

Для определения времени инкубации клеток с вирусом для дальнейших исследований уровней белков-участников путей клеточной гибели проводили анализ жизнеспособности клеток исследуемых культур глиом после инкубации с вирусным препаратом при выбранной множественности инфекции VV-GMCSF-Lact (1 БОЕ/кл). Кроме того, оценивали вклад апоптотических путей в механизмы гибели клеток глиом при выбранных условиях.

Апоптотические процессы характеризуются специфичными морфологическими особенностями и изменениями на молекулярном уровне. После получения рецептор-опосредованного или внутреннего сигнала к активации клеточной гибели, происходит активация инициаторных каспаз, белка p53 и белков семейства Bcl-2. Эта фаза апоптоза – индукторная или сигнальная, является обратимой. Следующая фаза, эффекторная, уже является точкой невозврата. В частности, для этой фазы характерно устранение асимметрии липидного слоя плазматической мембраны. В нормально функционирующей клетке фосфатидилхолин и сфингомиелин в основном присутствуют на внешней поверхности плазматической мембраны, тогда как фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и фосфатидилэтаноламин обращены внутрь [335]. Экстернализация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны является классической характеристикой апоптотических клеток [336] и действует как дальнейший сигнал «съешь меня», позволяющий фагоцитировать апоптотические тельца. Кроме того, происходит снижение мембранного потенциала митохондрий, образование апоптосомы, повышается проницаемость митохондриальной мембраны, и происходит активация эффекторных каспаз, которые блокируют биосинтез белков и активируют ДНКазу CAD (caspase-activated DNase — «ДНКазы, активируемая каспазами») [191,337], что приводит к гибели клетки и нарушению целостности плазматической мембраны.

Для исследования процессов клеточной гибели, запускаемых в клетках глиобластомы человека онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact, клетки immortalized (U87 MG и U343 MG) и полученных из образцов опухолей пациентов (BR1.20, BR3.20) культур обрабатывали вирусом в течение 24 часов. Идентификацию апоптотических клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США).

Согласно полученным данным (Рисунок 34), после 24 часов инкубации с вирусом количество апоптотических клеток в исследуемых культурах, имеющих различную чувствительность к действию VV-GMCSF-Lact, различается. В культуре BR1.20, самой чувствительной к вирусу, количество AnnV+/PI- клеток (57.7%; Рисунок 34 (Q3)) и AnnV+/PI+-клеток (89%; Рисунок 34 (Q2+Q3)) больше в сравнении с остальными исследуемыми культурами. При этом в самой устойчивой immortalized культуре U87 MG количество как AnnV+/PI- (19.7%; Рисунок 34 (Q3)), так и AnnV+/PI+-клеток (20%; Рисунок 34 (Q2+Q3)) значительно ниже.

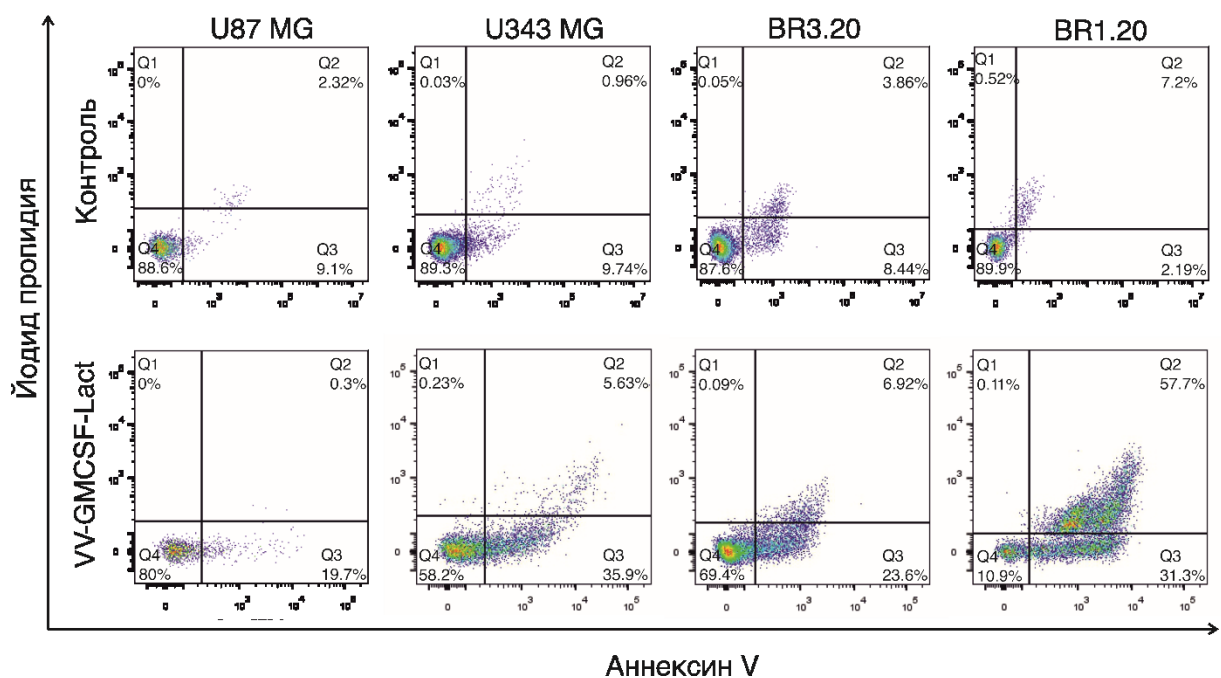


Рисунок 34. Анализ процессов клеточной гибели в клетках immortalized и полученных из образцов опухолей пациентов культур глиобластомы человека под действием VV-GMCSF-Lact. Популяции клеток: Q2 – погибшие клетки; Q3 – клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза; Q4 – живые клетки. Проточная цитометрия. Окрашивание Аннексином V (ось X) и PI (йодидом пропидия (ось Y)).

Как упомянуто ранее, клетки, положительные по Аннексину V, либо погибают по апоптотическому пути, либо уже мертвы. На основании того, что клетки исследуемых

культур в большей степени положительны только по Аннексину V (Рисунок 34 (Q3)), можно судить о преобладании апоптотического пути гибели клеток глиом под действием VV-GMCSF-Lact.

Представленные данные по количеству AnnV<sup>+</sup>-клеток (ранняя стадия апоптоза или уже погибшие) подтверждают результаты эксперимента о чувствительности исследуемых культур, полученные при определении цитотоксической активности вируса (**пункт 3.2.**).

Таким образом, поскольку при инкубации клеток глиом человека с VV-GMCSF-Lac в течение 24 часов при множественности инфекции 1 БОЕ около 50% клеток всех исследуемых культур остаются живыми, либо находятся на ранних стадиях апоптоза, этот временной интервал был выбран для проведения дальнейших исследований.

### **3.7.3. Оценка уровня белков, участвующих в VV-GMCSF-Lact-опосредованной гибели клеток глиом человека**

Помимо прямого лизиса клеток, инфицированных поксвирусами, к которым относится вирус осповакцины, гибель опухолевых клеток может проходить как по пути некроптоза [338,339], так и по апоптотическому пути [340,341]. С развитием вирусной инфекции в клетке происходит накопление дцРНК, которые являются важным патоген-ассоциированным молекулярным паттерном (PAMP). дцРНК индуцируют в клетке как развитие противовирусного ответа за счёт регуляции пути интерферона 1-го типа (IFN-1), так и каспаза-8-зависимого апоптоза [342]. ДцРНК может связываться с TLR3 (Toll-подобный рецептор 3), расположенным как на эндосомальной, так и плазматической мембране [343,344], что приводит к димеризации и переориентации цитоплазматического домена рецептора. Измененный домен рекрутирует TRAF (фактор, связанный с рецептором фактора некроза опухоли) и RIPK1 (взаимодействующий с рецептором белок 1). Таким образом, рипоптосома (комплекс, содержащий RIPK1, FADD и каспазу-8) образуется независимо от активации рецепторов, запускающих внешний путь апоптоза, и может формироваться в ответ на генотоксический стресс. Однако поксвирусы, в частности вирус осповакцины, кодируют серпины, ингибирующие каспазу-8. В зависимости от активности каспазы-8 в рипоптосоме, гибель клетки происходит по некроптотическому или апоптотическому пути. Ингибирование каспазы-8 является ключевым сигналом к некроптозу. Также показано, что в инфицированных вирусом осповакцины RIPK1/3-дефицитных клетках процессы некроптоза не развиваются [345]. Таким образом, при нарушениях в работе данных белков опухолевые клетки под воздействием онколитического вируса подвергаются гибели лишь за счет прямого лизиса клеток.

Оценку уровня белков, опосредующих активацию клеточной гибели клеток в клетках глиом под действием VV-GMCSF-Lact, проводили на клетках immortalized линий и культур, полученных из образцов опухолей.

Уровни белков RIPK1, RIPK3 и каспазы-8 были исследованы в клетках immortalized линий глиобластомы U87 MG и U343 MG и в клетках полученных из образцов опухолей культур BR1.20 и BR3.20, имеющих различную чувствительность к действию VV-GMCSF-Lact, до и после воздействия вирусного препарата (через 12 и 24 часа) с помощью методов ко-иммунопреципитации и вестерн-блот анализа. Множественность инфекции составляла 1 БОЕ/клетку.

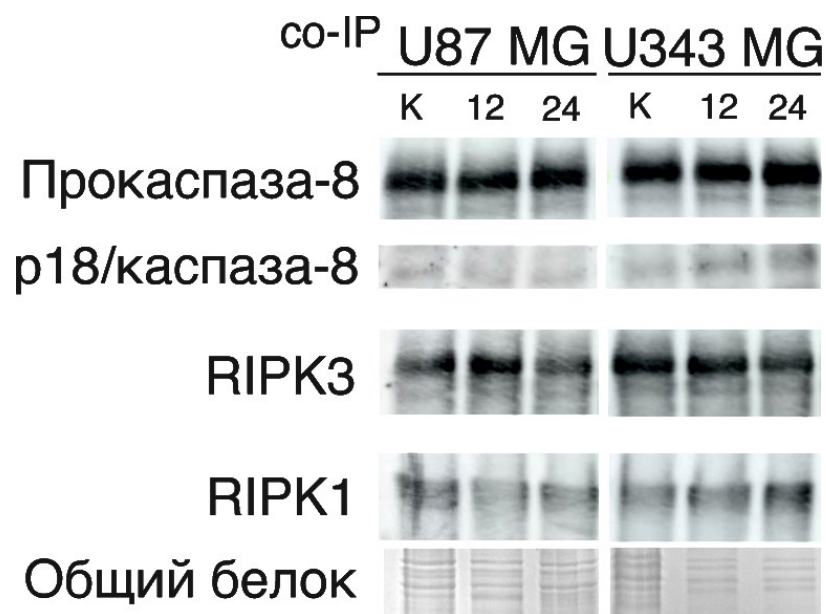


Рисунок 35. Анализ ко-иммунопреципитатов каспазы-8 в клетках U87 MG и U343 MG. Вестерн-блот. На рисунке представлены лизаты контрольных клеток и лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 12 и 24 часов.

Показано, что в клетках U343 MG формируется большее количество комплексов каспаза-8/RIPK1 и каспаза-8/RIPK3 (Рисунок 35). Уровень активной каспазы-8 возрастал в клетках U343 MG, более чувствительных к действию вируса, к 12 часам инкубации с вирусом, при этом к 24 часам снижался уровень RIPK3. Эти данные могут свидетельствовать об ингибировании некроптоза и активации апоптоза в данных клетках под действием вируса. Известно, что активная каспаза-8 ингибирует некроптоз, расщепляя не только RIPK1 и RIPK3, но и CYLD [346] и c-FLIP [347], которые также участвуют в регуляции каскадов клеточной гибели. В то же время, активация каспазы-8 запускает апоптотические процессы в клетке [348,349]. Таким образом, снижение уровня RIPK3

может свидетельствовать о начальной активации апоптоза, а его повышение – о последующей индукции некроптоза.

В клетках U87 MG уровень активной каспазы-8, напротив, снижался к 24 часам инкубации с VV-GMCSF-Lact, как и уровень белка RIPK3, что может свидетельствовать об ингибировании программируемых путей клеточной гибели. Уровень RIPK1 значительно не изменялся с течением времени в клетках обеих культур, однако был выше в клетках U343 MG. При этом уровень исследуемых белков в клетках U87 MG и U343 MG в контрольной точке был практически одинаковым.

Можно предположить, что в течение 24 часов инкубации с вирусом клетки U343 MG могут подвергаться гибели по апоптотическому пути. Более низкий уровень каспазы-8 в клетках U87 MG, устойчивых к VV-GMCSF-Lact, может свидетельствовать о том, что гибель по апоптотическому пути в этих клетках происходит менее эффективно, как и гибель по некроптотическому пути, так как уровни RIPK1 и RIPK3 в клетках U87 MG ниже во всех временных точках инкубации с вирусом.

Согласно данным, полученным при анализе уровня исследуемых белков в клетках культур, полученных из образцов опухолей пациентов, в культуре BR1.20, более чувствительной к действию VV-GMCSF-Lact по сравнению с культурой BR3.20, уровень активированной каспазы-8 повышается к 24 часам инкубации с вирусом, в то же время уровень белка RIPK3 остается неизменным, что, вероятно, свидетельствует об активации как некроптоза, так и позднего апоптоза (Рисунок 36). Уровень белка RIPK1 не изменялся на протяжении всего времени инкубации с вирусом, лишь незначительно повышался в культуре BR3.20 к 24 часам.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что с увеличением времени инкубации клеток глиобластомы с VV-GMCSF-Lact возрастает уровень активированной каспазы-8. При этом в клетках, более чувствительных к VV-GMCSF-Lact, активация фермента происходит уже к 24 часам инкубации. Снижение уровня RIPK3 при повышении уровня каспазы-8 позволяет предположить, что VV-GMCSF-Lact способен активировать в клетках глиобластомы рецептор-опосредованный путь апоптотической гибели. При этом в более устойчивых к действию вируса клетках активация как некроптоза, так и апоптоза происходит на более поздних стадиях инфицирования.

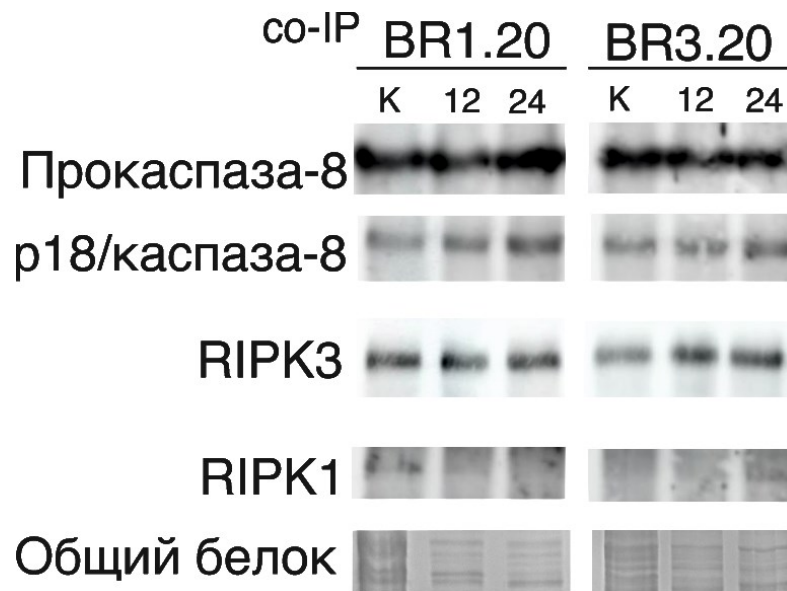


Рисунок 36. Анализ ко-иммунопреципитатов каспазы-8 в клетках BR1.20 и BR3.20. Вестерн-блот. На рисунке представлены лизаты контрольных клеток и лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 12 и 24 часов.

#### 3.7.4. Анализ уровня белков, участвующих в активации митохондриального пути апоптоза в клетках глиом человека под действием VV-GMCSF-Lact

Онколитический вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact экспрессирует лактаптин, протеолитический фрагмент каппа-казеина молока человека, который индуцирует апоптоз опухолевых клеток по митохондриальному (внутреннему) пути. Действие лактапина приводит к снижению уровня анти-апоптотического белка Bcl-2 и увеличению уровня про-апоптотического белка Bax, изменению трансмембранного потенциала митохондрий и активации каспаз-3,7 [350,351]. Однако известно, что зачастую в клетках глиобластомы наблюдается высокий уровень белка XIAP, ингибирующего эти каспазы [198]. Также на эффективность реализации апоптоза, индуцируемого лактапином, может влиять уровень в опухолевых клетках белка Smac, который в нормально функционирующих клетках находится в межмембранном пространстве митохондрий. При активации апоптоза по митохондриальному пути и увеличении проницаемости мембран митохондрий Smac покидает митохондрии и участвует в связывании белков-ингибиторов каспаз, таких как XIAP [352].

Оценку уровня белков, опосредующих активацию апоптоза в клетках глиом под действием VV-GMCSF-Lact, проводили на разных клеточных моделях глиомы человека:



клетках immortalized линий и клетках культур, полученных из образцов опухолей пациентов.

В первую очередь, оценку уровня белков, способных оказывать влияние на эффективность гибели клеток по апоптотическому пути под действием онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, проводили в клетках immortalized линий глиобластомы человека U87 MG и U343 MG с разной чувствительностью к вирусу. CD50 (множественность инфекции, при которой погибает 50% клеток) для клеток линии U87 MG составляет 0.1 БОЕ/клетку, а для клеток линии U343 MG – 0.06 БОЕ/клетку. С помощью методов ко-иммунопреципитации и последующего Вестерн-блот анализа мы проанализировали изменение уровня белка Smac в комплексе с XIAP и белка p53 в клетках через 6, 12 и 24 часа инкубации с вирусом, уровень каспазы-7 оценивали через 12 и 24 часа.

Согласно полученным данным уровень белка XIAP был выше в клетках U87 MG, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, по сравнению с U343 MG. Уровень белка Smac в комплексе с XIAP при этом был ниже, однако повышался к 24 часам инкубации с вирусом (Рисунок 37). В клетках U343 MG уровень Smac напротив снижался к 24 часам.

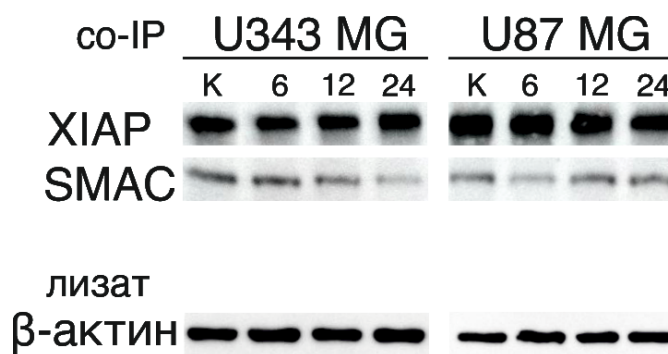


Рисунок 37. Анализ ко-иммунопреципитатов XIAP и Smac в клетках immortalized линий U87 MG и U343 MG. Вестерн-блот. К- лизаты контрольных клеток; 6, 12, 24 - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 6, 12 и 24 часов.

Снижение уровня Smac может свидетельствовать об ингибировании апоптоза в процессе развития вирусной инфекции. Вирус осповакцины несёт гены, кодирующие белки – гомологи Bcl-2, способные ингибировать апоптоз путем связывания белков Bax (Bcl-2-подобный белок 4) и Bak (гомологичный антагонист/киллер Bcl-2) [353,354]. Bax и Bak, согласно литературным данным, участвуют в увеличении проницаемости

митохондриальной мембраны и опосредуют выход в цитоплазму таких молекул, как Smac, HtrA2 и цитохром C [191,355].

Белок p53 является одним из основных регуляторов апоптотической гибели клеток. С одной стороны, p53 выступает в роли транскрипционного фактора, контролируя экспрессию проапоптотических генов Bax [356], Noxa (Белок 1, индуцированный форбол-12-миристат-13-ацетатом, PMAIP1) [357], p53AIP1 (p53-регулируемый белок 1, индуцирующий апоптоз) [358] и Puma (p53-активируемый модулятор апоптоза) [359] и антиапоптотического гена, кодирующего белок Bcl2. Помимо транскрипционной активности, p53, перемещаясь в митохондрии, вступает во взаимодействие с белками Bcl-семейства (BclXL/Bcl2 и Bak, соответственно), регулируя проницаемость митохондриальных мембран. Одним из основных механизмов регуляции активности p53 является MDM2-зависимая деградация. При возникновении апоптотических стимулов p53 освобождается из ингибирующего комплекса с MDM2, и его количество в клетке увеличивается. Мы проанализировали уровень белка p53 в клетках U87 MG и U343 MG до и после воздействия VV-GMCSF-Lact. Согласно полученным данным в клетках U343 MG, более чувствительных к действию вируса, уровень p53 достоверно выше через 12 и 24 часа инкубации с препаратом, по сравнению с U87 MG (Рисунок 38). Также стоит отметить, что в клетках U87 MG уровень p53 достоверно снижается уже к 12 часам инкубации с вирусом. Вероятно, это связано с накоплением вирусной киназы B1R, которая относится к ранним генам и инициирует MDM2-зависимое ингибирование p53 [244], что ведёт к подавлению апоптотических процессов.

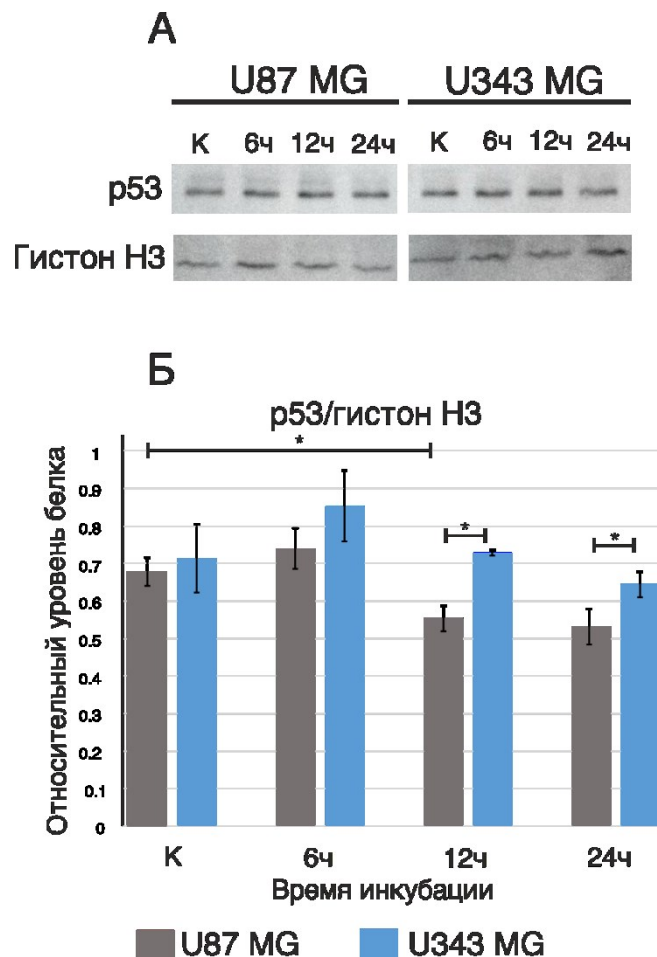


Рисунок 38. **А** – Анализ содержания белка p53 в клетках U87 MG и U343 MG. Вестерн-блот. В качестве «загрузочного» контроля использован гистон H3. К - лизаты контрольных клеток; 6ч, 12ч, 24ч - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 6, 12 и 24 часов. **Б** – Относительный уровень белка p53 в клетках U87 MG и U343 MG до и после инкубации с VV-GMCSF-Lact. (\* $p < 0.05$ ). Денситометрический анализ проведен с использованием программного обеспечения Gel-Pro Analyzer 3.1. Представлены средние значения  $\pm$ SD трех независимых экспериментов, нормализацию проводили относительно уровня гистона H3. Статистическая обработка выполнена с использованием t-критерия Стьюдента.

Как отмечено выше, лактапин, экспрессируемый VV-GMCSF-Lact, приводит к активации эффекторных каспаз-3,7. При индукции апоптоза прокаспаса-7 сначала превращается в промежуточное соединение, которое далее процессируется с образованием активных субъединиц. Оценив уровень каспазы-7 в клетках immortalized культур глиобластомы человека U87 MG и U343 MG до и после воздействия VV-GMCSF-Lact, мы можем сделать вывод, что под действием вируса осповакцины митохондриальный путь апоптоза в опухолевых клетках действительно

ингибируется, поскольку уровень промежуточной формы каспазы-7 снижается к 24 часам инкубации. Активированная каспаза-7 в данных клетках не обнаруживалась (Рисунок 39).

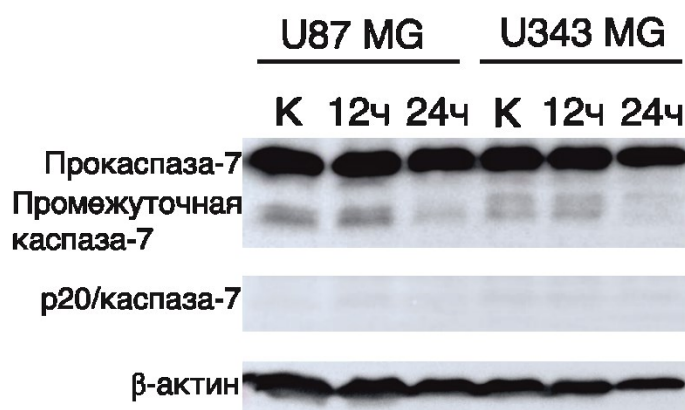


Рисунок 39. Анализ содержания каспазы-7 в клетках U87 MG и U343 MG. Вестерн-блот. В качестве «загрузочного» контроля использован  $\beta$ -actin. К - лизаты контрольных клеток; 12ч, 24ч - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 12 и 24 часов.

Кроме того, была проведена оценка уровня белков, способных опосредовать эффективность митохондриального пути апоптоза, в клетках культур BR1.20 и BR3.20 до и после воздействия VV-GMCSF-Lact.

В клетках BR3.20, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact по сравнению с BR1.20, уровень XIAP был выше, а уровень Smac, соответственно, повышался к 24 часам инкубации с вирусом (Рисунок 40). При этом уровень Smac в комплексе с XIAP не снижался в клетках BR1.20, характеризующихся высокой чувствительностью к VV-GMCSF-Lact, что может свидетельствовать об эффективном развитии апоптоза по митохондриальному пути в данных клетках.

Кроме того, при оценке ко-иммунопреципитатов XIAP показано, что уровень белка XIAP, ингибирующего апоптоз, в клетках культур, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, был выше на базовом уровне (в контрольной точке) (Рисунок 41А). Более того, в клетках всех культур, кроме BR3.20 уровень XIAP возрастает к 24 часам инкубации с вирусом и коррелирует с устойчивостью клеток к VV-GMCSF-Lact (Рисунок 41Б), что может свидетельствовать об ингибировании апоптоза.

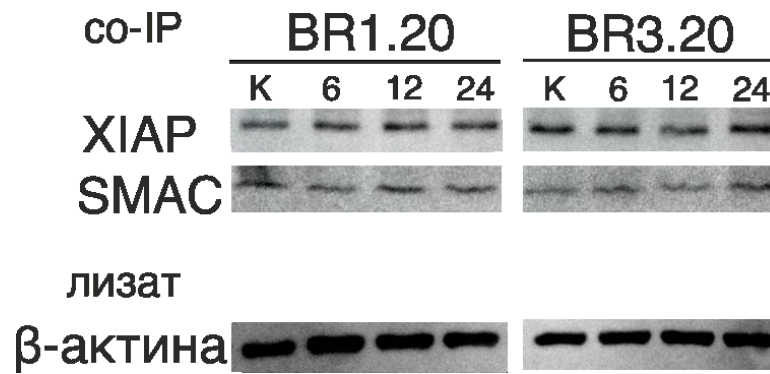


Рисунок 40. Анализ уровней белков XIAP и Smac в ко-иммунопреципитатах клеток персонализированных культур BR1.20 и BR3.20. Вестерн-блот. К- лизаты контрольных клеток; 6, 12, 24 - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 6, 12 и 24 часов.

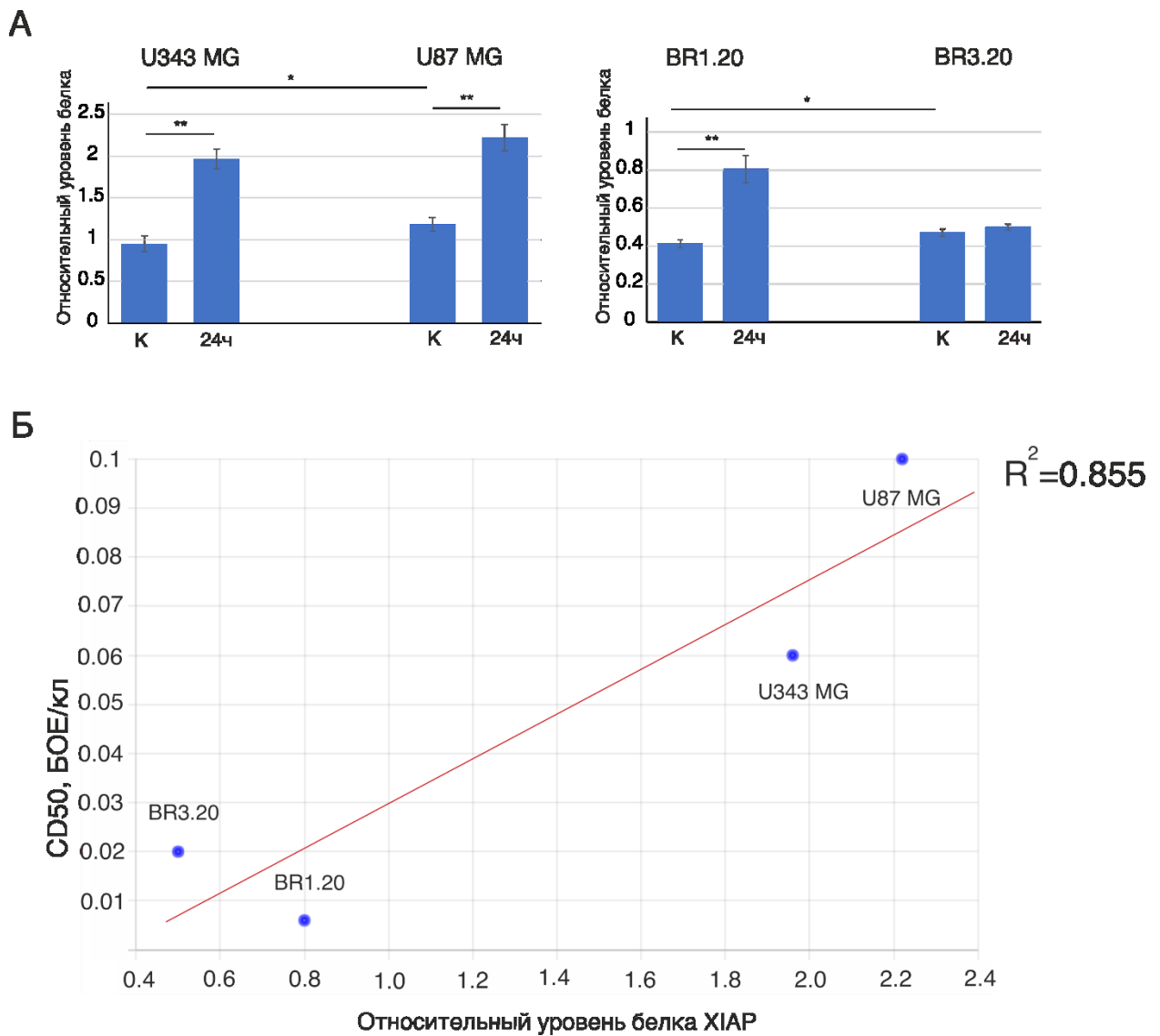


Рисунок 41. Изменение уровня белка XIAP под действием VV-GMCSF-Lact в ко-иммунопреципитатах клеток глиом с различной чувствительностью к вирусу. А – относительный уровень белка XIAP под действием VV-GMCSF-Lact в ко-

иммунопреципитатах клеток глиом с различной чувствительностью к вирусу (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ); Б – корреляция между относительным уровнем XIAP в клетках глиом и чувствительностью клеток к действию VV-GMCSF-Lact (CD50). Нормализацию уровня XIAP проводили относительно уровня  $\beta$ -актина. К - лизаты контрольных клеток; 24 - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 24 часов.

Уровень белка p53 в клетках культуры BR1.20, более чувствительной к VV-GMCSF-Lact, был выше к 12 и 24 часам инкубации с вирусом (Рисунок 42). В клетках культуры BR3.20, аналогично данным эксперимента с клетками U87 MG и U343 MG, уровень p53 снижался к 24 часам инкубации. При этом, в более чувствительных клетках BR1.20 уровень p53 достоверно возрастает к 12 часам инкубации с VV-GMCSF-Lact. Также установлена отрицательная корреляция между относительным уровнем белка p53 в клетках глиом и чувствительностью к действию вируса (Рисунок 43). Таким образом, можно сделать вывод, что данный белок играет важную роль в ответе на терапию с помощью VV-GMCSF-Lact, в частности, на активацию клеточной гибели посредством экспрессируемого лактапина.

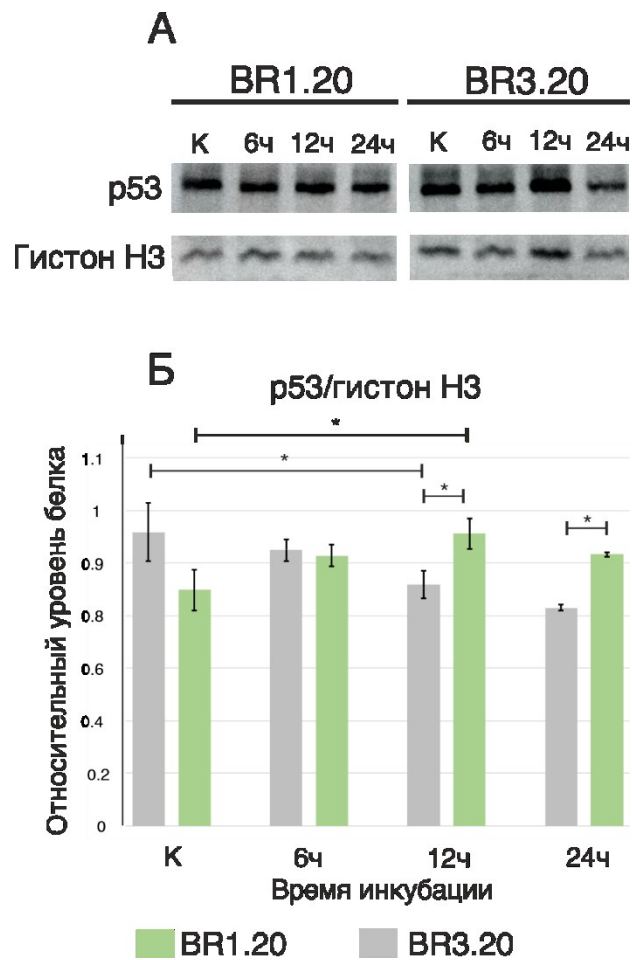


Рисунок 42. А – Анализ содержания белка p53 в клетках культур BR1.20 и BR3.20. Вестерн-блот. В качестве «загрузочного» контроля использован гистон Н3. К - лизаты контрольных клеток; 6ч, 12ч, 24ч - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 6, 12 и 24 часов. Б – Относительный уровень белка p53 в клетках BR1.20 и BR3.20 до и после инкубации с VV-GMCSF-Lact (\* $p < 0.05$ ). Денситометрический анализ проведен с использованием программного обеспечения Gel-Pro Analyzer 3.1. Представлены средние значения  $\pm$ SD трех независимых экспериментов, нормализацию проводили относительно уровня гистона Н3. Статистическая обработка выполнена с использованием t-критерия Стьюдента.

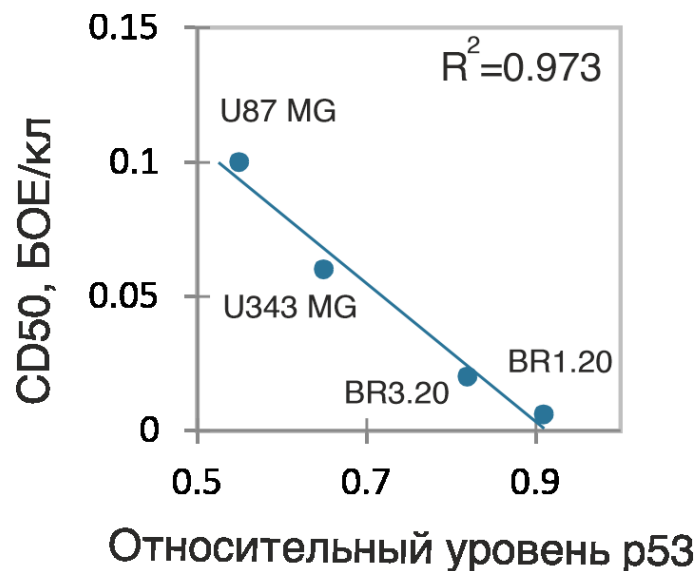


Рисунок 43. Корреляция между относительным уровнем p53 в клетках глиом и чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact (CD50). Нормализацию уровня p53 проводили относительно уровня  $\beta$ -актина.

Кроме того, BR1.20 - единственная культура, в клетках которой детектируется активированная каспаза-7, что свидетельствует о необратимой активации митохондриального пути апоптоза (Рисунок 44). Стоит также отметить, что в клетках BR1.20 уровень интермедиата каспазы-7 к 24 часам инкубации с VV-GMCSF-Lact значительно увеличивается по сравнению с клетками других проанализированных культур, где уровень данного белка напротив снижается со временем инкубации с вирусом.

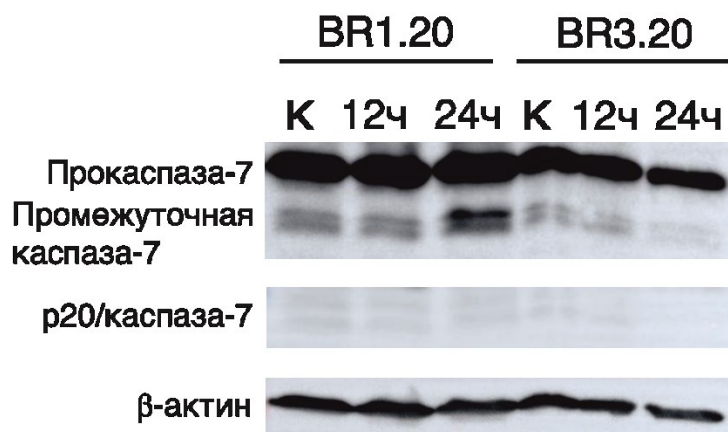


Рисунок 44. Анализ содержания каспазы-7 в клетках культур BR1.20 и BR3.20. Вестерн-блот. В качестве «загрузочного» контроля использован  $\beta$ -актин. К - лизаты контрольных клеток; 12 ч, 24 ч - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 12 и 24 часов.



Таким образом, можно предположить, что в клетках наиболее чувствительной к VV-GMCSF-Lact культуры BR1.20 процессы, ведущие к апоптотической гибели по митохондриальному пути, происходят более эффективно. В совокупности с данными оценки комплексов RIPK1,3/каспазы-8, можно заключить, что апоптоз является основным путем гибели клеток глиобластомы под действием VV-GMCSF-Lact, что является несомненным преимуществом, поскольку развитие воспалительных реакций при некрозе опухолевых клеток головного мозга является нежелательным фактором.

Активация путей клеточной гибели в более устойчивых к VV-GMCSF-Lact клетках происходит позже и менее эффективно, что можно объяснить нарушениями апоптотического сценария в этих клетках, о чем, в частности, свидетельствует снижение уровня p53 в устойчивых к вирусу клетках. Кроме того, уровень белка XIAP, ингибирующего апоптоз, в клетках культур, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, был выше. Показано, что высокая экспрессия XIAP при глиобластоме коррелирует с низкой выживаемостью пациентов [198,360]. Также мы показали, что в клетках глиобластомы, более устойчивых к VV-GMCSF-Lact, выше уровень активированной киназы Akt. При этом, известно, что существует взаимосвязь между активацией Akt1 и высокой экспрессией XIAP в опухолевых клетках [361–363]. Согласно литературным данным, нокдаун XIAP и использование низкомолекулярных ингибиторов не только приводит к индукции апоптоза в клетках опухоли, но и увеличивает их чувствительность к химиотерапии [197,364,365]. Таким образом, XIAP и Akt1 являются потенциальными мишенями, воздействие на которые способно повысить эффективность реализации апоптотических программ в клетках глиобластомы в комбинации с онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact.

### **3.7.5. Предлагаемая модель молекулярного механизма, определяющего чувствительность клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact**

Совокупность данных, полученных при выполнении данной работы, позволяет предположить, что эффективность гибели клеток глиом под действием VV-GMCSF-Lact зависит как от уровня белков – участников путей клеточной гибели опухолевых клеток, так и от уровня вирусных белков, кодируемых ранними генами и необходимых для эффективной репликации вируса в клетке (Рисунок 45). Проникновение вируса в клетку активирует различные сигнальные пути, в частности PI3K/Akt. Фосфорилирование Akt1 происходит также за счет гиперактивации mTORC2 в процессе вирусной инфекции.

Накопление дцДНК активирует образование некроптомом. В зависимости от активности каспазы-8 в комплексе с RIPK1,3 и другими белками, активируется рецептор-опосредованный (внешний) путь апоптоза либо некроптоз. Лактаптин, экспрессируемый VV-GMCSF-Lact, активирует митохондриальный (внутренний) путь апоптотической гибели. Увеличивается экспрессия Bак и Вах, снижается уровень Bcl-2, что ведет к увеличению проницаемости митохондриальной мембраны. При высвобождении цитохрома С происходит образование апоптосомы, опосредующей активацию инициаторной каспазы-9 и, в дальнейшем, каспаз-3,7. При этом в клетке могут присутствовать ингибиторы апоптоза и каспаз, в частности, белок XIAP. Однако из межмембранного пространства митохондрий высвобождается также белок Smac, который является вторичным активатором каспаз и связывает XIAP, подавляя его ингибирующую функцию. Кроме того, в клетках происходит накопление вирусных белков, необходимых для успешной репликации вируса. Так, белки B13 и B22 могут ингибировать каспазу-8. Белки F1, N1 и другие являются гомологами Bcl-2 и связывают Bак и Вах, предотвращая увеличение проницаемости митохондриальной мембраны. Белок B1R, в свою очередь, активирует MDM2-зависимую деградацию p53, что приводит также к снижению проницаемости митохондриальной мембраны. Кроме того, снижается экспрессия проапоптотических генов.

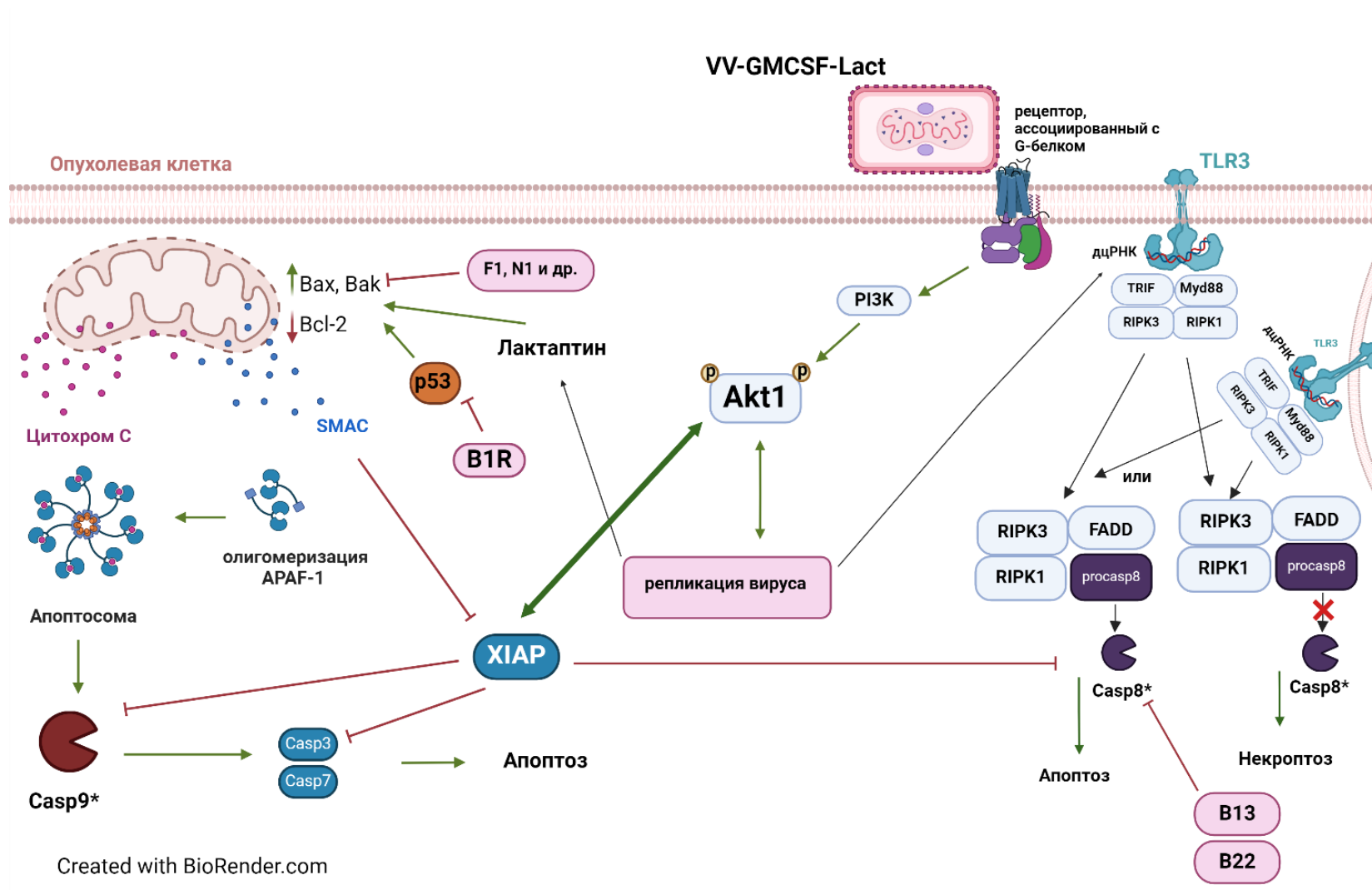


Рисунок 45. Обобщенная схема молекулярных событий, способных опосредовать чувствительность/устойчивость клеток глиобластомы к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact.

В данной работе проведена оценка уровня белков, способных опосредовать проникновение онколитического вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact в клетки immortalized и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов. Мы показали, что молекулярные механизмы, регулирующие проникновение вируса в опухолевые клетки, могут значительно различаться в разных клеточных моделях глиобластомы: в клетках immortalized и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов. При этом эффективность проникновения VV-GMCSF-Lact в клетки глиом не обеспечивает эффективное онколитическое действие вируса, поскольку для достижения цитотоксического эффекта проникший в клетку вирус должен успешно реплицироваться. VV-GMCSF-Lact несёт делеции в генах вирусной тимидинкиназы и ростового фактора, что не позволяет ему реплицироваться в здоровых, нормально делящихся клетках. Однако опухолевые клетки также могут иметь различный уровень ростовых факторов и других белков, необходимых для репликации вирусной ДНК и последующей сборки новых вирусных частиц, что будет определять противоопухолевую эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении разных опухолей.

Однако, на основании полученных данных, можно заключить, что в клетках глиобластомы человека, устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, детектируется более высокий уровень активированной киназы Akt1. Литературные данные о том, что киназа Akt1 способна ингибировать митохондриальный путь апоптоза, позволяют предположить, что ее активация в опухолевых клетках в процессе вирусной инфекции снижает эффективность цитотоксического действия рекомбинантного вируса, экспрессирующего трансген лактаптин – индуктор апоптоза по митохондриальному пути.

В ходе оценки уровня белков, участвующих в формировании некропсомы – необходимого звена в инициации некроптоза – мы показали, что с увеличением времени инкубации клеток глиобластомы с VV-GMCSF-Lact возрастает уровень активированной каспазы-8. При этом в клетках, более чувствительных к VV-GMCSF-Lact, активация фермента происходит уже к 24 часам инкубации. Снижение уровня RIPK3 при повышении уровня каспазы-8 позволяет предположить, что VV-GMCSF-Lact способен активировать в клетках глиобластомы рецептор-опосредованный путь апоптотической гибели.

Анализ уровня белков, вовлеченных в активацию лактаптин-опосредованного митохондриального пути апоптоза, показал, что в устойчивых к вирусу клетках снижается уровень p53, что может свидетельствовать о подавлении апоптотических процессов в данных клетках. Более того, уровень белка XIAP, ингибирующего апоптоз, в клетках более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact культур также был выше. Как было отмечено, существует взаимосвязь между экспрессией XIAP, ингибитора каспаз, и

активацией киназы Akt1. Таким образом, направленное воздействие на одну из этих молекул в комбинации с виротерапией VV-GMCSF-Lact позволит повысить эффективность действия вируса и ещё больше сдвинуть путь гибели клеток в сторону апоптоза.

В то же время в клетках некоторых культур снижается уровень белка Smac, вторичного активатора каспаз, выход которого из митохондрий может быть снижен за счет накопления в опухолевых клетках Bcl-2-подобных вирусных белков F1, N1 и других [366–368], которые связывают Bak и Bax, препятствуя повышению проницаемости митохондриальных мембран и выходу других проапоптотических молекул. Кроме того, снижение уровня p53 в клетках глиобластомы под действием VV-GMCSF-Lact можно объяснить накоплением в клетках другого вирусного белка – киназы B1R. Серин/треонин киназа B1R опосредует выживание инфицированных вирусом осповакцины клеток, активируя JNK (N-концевые киназы c-Jun)-путь. Кроме того, B1R фосфорилирует p53, инициируя его MDM2-зависимую деградацию [244,369]. Следовательно, дополнительная модификация онколитического вируса путем делеций генов, кодирующих белки-ингибиторы апоптоза, позволит ещё больше повысить его цитотоксичность в отношении опухолевых клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Виротерапия на сегодняшний день является одним из наиболее активно разрабатываемых подходов лечения злокачественных новообразований. Онколитические вирусы различного происхождения уже зарекомендовали себя в клинике, в частности, впервые в России проходят клинические испытания препарата на основе онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в качестве средства терапии рака молочной железы.

Ранее в мире уже были одобрены препараты на основе онколитических вирусов для терапии опухолей различного гистогенеза [370]. Первым одобренным противоопухолевым препаратом на основе онколитического вируса был Ригвир (Rigvir), созданный на основе энтеровируса. Препарат одобрили в 2004 году в Латвии для терапии меланомы [371]. В ноябре 2005 года в Китае был одобрен препарат Онкорин (Oncorine) на основе аденовируса для лечения опухолей головы и шеи [372]. В 2015 году Имлигик (Imlygic), разработанный на основе генетически модифицированного вируса простого герпеса типа 1, был одобрен FDA для лечения меланом [373]. А в Японии в 2022 году одобрен препарат Делитакт (Delytact) - первый онколитический вирус для лечения рецидивизирующей глиобластомы. Таким образом, прогресс в данной области подтверждает целесообразность дальнейших исследований.

Глиомы являются самыми распространенными опухолями центральной нервной системы. Образования 2-3 степени злокачественности часто перерождаются в опухоли 4 степени, которые являются практически 100% летальными. Даже при максимальной резекции опухолей головного мозга риск рецидивов очень велик из-за невозможности удалить всю опухолевую массу по причинам диффузного роста глиальных опухолей и жизненной важности органа, в котором лоцируется образование. Кроме того, глиомы характеризуются ярко-выраженной гетерогенностью и развитием резистентности к различным терапевтическим подходам, что также является причиной отсутствия значимых достижений в терапии данных новообразований. Таким образом, разработка подходов терапии опухолей головного мозга является важной задачей современных исследований.

В данной работе впервые проведена оценка противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиом. Показано, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью *in vitro* и способен ингибировать рост опухолей на различных *in vivo* моделях. Оценка совместного действия VV-GMCSF-Lact и темозоломида, который является на сегодняшний день золотым стандартом в лечении опухолей головного мозга, позволила сформулировать предполагаемую схему терапии в

последующих исследованиях. Согласно предложенному подходу, ТМЗ следует вводить в терапевтическую схему не ранее чем через 7-8 суток после применения VV-GMCSF-Lact.

Кроме того, рассмотрены сигнальные пути, способные опосредовать эффективность виротерапии с помощью VV-GMCSF-Lact, и предложен возможный механизм формирования устойчивости клеток глиом к VV-GMCSF-Lact. Показано, что в более устойчивых к действию вируса клетках происходит повышение уровня белков Akt1 и XIAP, которые задействованы в каскадах ингибирования апоптоза. Дополнительное таргентное воздействия на эти молекулы, либо вышестоящие эффекторы, позволит усилить эффект от виротерапии, а также сдвинуть процесс гибели клеток в сторону апоптоза.

Таким образом, VV-GMCSF-Lact является перспективным препаратом для дальнейших доклинических и клинических испытаний в качестве средства терапии глиом. При этом для необходимы дальнейшие исследования механизмов, обуславливающих эффективность виротерапии опухолей головного мозга с помощью VV-GMCSF-Lact. Дополнительные испытания, а также анализ действия онколитического вируса совместно с препаратами, нацеленными на обнаруженные молекулы, и другими иммунотерапевтическими агентами, позволят перейти от универсального подхода в терапии глиом к более индивидуальному и точному, что, несомненно, улучшит качество жизни пациентов с данным диагнозом.

## ВЫВОДЫ

1. Получена и охарактеризована панель культур клеток глиом человека из образцов опухолей различной степени злокачественности. Показано, что уровень маркеров стволовых опухолевых клеток (CD133, CD44, CD15, CD171, SOX-2, c-Myc) и маркеров EGFR и PDGFRA в клетках полученных культур и immortalized линий глиом человека не коррелирует со степенью злокачественности первичной опухоли;

2. Показана высокая цитотоксическая активность онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении клеток immortalized линий глиобластомы и полученных из образцов опухолей пациентов культур глиом. Чувствительность клеток к вирусу не зависит от степени злокачественности первичной опухоли и возрастает в ряду BR4.21<BR5.21<MG1<U87MG<MG4<U343MG<BR3.20<BR1.20<BR3.20<BR2.20<AS2;

3. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact является перспективным противоопухолевым препаратом для лечения глиом человека:

3.1 При внутривенном введении как здоровым животным, так и животным с ортотопически трансплантированной глиобластомой, VV-GMCSF-Lact распределяется по всем органам и тканям, включая мозг, и селективно реплицируется в опухолевой ткани;

3.2 При внутриопухолевом введении препарата мышам с подкожно трансплантированной глиобластомой человека индексы торможения роста опухолей и искусственного метастаза (ТРО) составили не менее 84%;

3.3 При внутриопухолевом введении крысам с ортотопически трансплантированной глиомой C6 VV-GMCSF-Lact предотвращает развитие метастазов. При внутривенном введении вирусного препарата происходит достоверное уменьшение объемов опухолей (ТРО=60%);

3.4 VV-GMCSF-Lact, как в режиме монотерапии, так и в комбинации с темозоломидом (ТРО = 93 – 96%), обладает большей противоопухолевой эффективностью, чем темозоломид (ТРО= 33%), на мышинной модели подкожных ксенографтов глиобластомы человека. Применение комбинации VV-GMCSF-Lact и темозоломида является перспективным подходом терапии глиом. Предложена терапевтическая схема совместного применения препаратов;

4. Показано, что в клетках глиом, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, снижается уровень белка p53 и повышается уровень белков-ингибиторов апоптоза: активированной киназы Akt1 и белка XIAP, которые могут являться потенциальными мишенями таргетной терапии в комбинации с VV-GMCSF-Lact;



5. Предложен возможный механизм, определяющий чувствительность клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, основанный на взаимодействии клеточных белков - участников процессов апоптоза и некроптоза, и вирусных белков, способных влиять на элементы сигнальных путей клеточной гибели.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cantrell J.N. , Waddle M.R. , Rotman M. , Peterson J.L. , Ruiz-Garcia H. , Heckman M.G. , Quiñones-Hinojosa A. , Rosenfeld S.S. , Brown P.D. , Trifiletti D.M. Progress Toward Long-Term Survivors of Glioblastoma. // Mayo Clinic Proceedings. – 2019. – V. 94 – P. 1278–1286. – doi:10.1016/j.mayocp.2018.11.031.
2. Janjua T.I. , Rewatkar P. , Ahmed-Cox A. , Saeed I. , Mansfeld F.M. , Kulshreshtha R. , Kumeria T. , Ziegler D.S. , Kavallaris M. , Mazzeri R. , et al. Frontiers in the Treatment of Glioblastoma: Past Present and Emerging. // Advanced Drug Delivery Reviews .– 2021. – V. 171. – P. 108–138. –doi:10.1016/j.addr.2021.01.012.
3. Ostrom Q.T. , Cote D.J. , Ascha M. , Kruchko C. , Barnholtz-Sloan J.S. Adult Glioma Incidence and Survival by Race or Ethnicity in the United States From 2000 to 2014. // JAMA Oncol. – 2018. – V. 4. –P. 1254. – doi:10.1001/jamaoncol.2018.1789.
4. Miller K.D. , Ostrom Q.T. , Kruchko C. , Patil N. , Tihan T. , Cioffi G. , Fuchs H.E. , Waite K.A. , Jemal A. , Siegel R.L. , et al. Brain and Other Central Nervous System Tumor Statistics 2021.// CA A Cancer J Clin – 2021 – V. 71. – P. 381–406. – doi:10.3322/caac.21693.
5. Jia J.L. , Alshamsan B. , Ng T.L. Temozolomide Chronotherapy in Glioma: A Systematic Review. // Current Oncology. – 2023. – V. 30. – P. 1893–1902. – doi:10.3390/curroncol30020147.
6. Yang L. , Gu X. , Yu J. , Ge S. , Fan X. Oncolytic Virotherapy: From Bench to Bedside. // Front. Cell Dev. Biol. – 2021. – V. 9. – P. 790150. – doi:10.3389/fcell.2021.790150.
7. Todo T. , Ito H. , Ino Y. , Ohtsu H. , Ota Y. , Shibahara J. , Tanaka M. Intratumoral Oncolytic Herpes Virus G47Δ for Residual or Recurrent Glioblastoma: A Phase 2 Trial. // Nat Med. – 2022. – V. 28. – P.1630–1639. – doi:10.1038/s41591-022-01897-x.
8. Wu W. , Klockow J.L. , Zhang M. , Lafortune F. , Chang E. , Jin L. , Wu Y. , Daldrup-Link H.E. Glioblastoma Multiforme (GBM): An Overview of Current Therapies and Mechanisms of Resistance. // Pharmacological Research. – 2021. – V. 171. – P. 105780. – doi:10.1016/j.phrs.2021.105780.
9. Feldheim J. , Kessler A.F. , Monoranu C.M. , Ernestus R.-I. , Löhr M. , Hagemann C. Changes of O6-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation in Glioblastoma Relapse—A Meta-Analysis Type Literature Review. // Cancers. – 2019. – V. 11. – P. 1837. –doi:10.3390/cancers11121837.
10. Wang E.J. , Chen J.-S. , Jain S. , Morshed R.A. , Haddad A.F. , Gill S. , Beniwal A.S. , Aghi M.K. Immunotherapy Resistance in Glioblastoma. // Front. Genet. – 2021. – V. 12. – P. 750675. –doi:10.3389/fgene.2021.750675.

11. Ou A. , Yung W.K.A. , Majd N. Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. // IJMS. – 2020. – V. 22. – P. 351. – doi:10.3390/ijms22010351.
12. Zhang Q. , Liu F. Advances and Potential Pitfalls of Oncolytic Viruses Expressing Immunomodulatory Transgene Therapy for Malignant Gliomas. // Cell Death Dis. – 2020. – V. 11. – P. 485. – doi:10.1038/s41419-020-2696-5.
13. Raja J. , Ludwig J.M. , Gettinger S.N. , Schalper K.A. , Kim H.S. Oncolytic Virus Immunotherapy: Future Prospects for Oncology. // j. immunotherapy cancer. – 2018. – V. 6. – P. 140. – doi:10.1186/s40425-018-0458-z.
14. Louis D.N. , Perry A. , Wesseling P. , Brat D.J. , Cree I.A. , Figarella-Branger D. , Hawkins C. , Ng H.K. , Pfister S.M. , Reifenberger G. , et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. // Neuro-Oncology. – 2021. – V. 23. – P.1231–1251. –doi:10.1093/neuonc/noab106.
15. Li T. , Li J. , Chen Z. , Zhang S. , Li S. , Wageh S. , Al-Hartomy O.A. , Al-Sehemi A.G. , Xie Z. , Kankala R.K. , et al. Glioma Diagnosis and Therapy: Current Challenges and Nanomaterial-Based Solutions. Journal of Controlled Release. – 2022. – V. 352. – P. 338–370. – doi:10.1016/j.jconrel.2022.09.065.
16. Luo J. , Junaid M. , Hamid N. , Duan J.-J. , Yang X. , Pei D.-S. Current Understanding of Gliomagenesis: From Model to Mechanism. Int. J. Med. Sci. – 2022. – V. 19. – P. 2071–2079. –doi:10.7150/ijms.77287.
17. <https://gco.iarc.fr> // Интернет-ресурс.
18. Wesseling P. , Capper D. WHO 2016 Classification of Gliomas.// Neuropathol Appl Neurobiol. – 2018. – V. 44. –P. 139–150. – doi:10.1111/nan.12432.
19. Scherer H. J. Cerebral Astrocytomas and Their Derivatives. // The American Journal of Cancer. – 1940. – V. 40. – P. 159–198. – doi:10.1158/ajc.1940.159.r1.
20. Montemurro N. Glioblastoma Multiforme and Genetic Mutations: The Issue Is Not Over Yet. An Overview of the Current Literature.// J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg. – 2020. – V. 81. –P. 064–070. – doi:10.1055/s-0039-1688911.
21. Kros J.M. , Waarsenburg N. , Hayes D.P. , Hop W.C.J. , van Dekken H. Cytogenetic Analysis of Gemistocytic Cells in Gliomas. // J Neuropathol Exp Neurol. – 2000. – V. 59. – P. 679–686. –doi:10.1093/jnen/59.8.679.
22. Kozak K.R. , Moody J.S. Giant Cell Glioblastoma: A Glioblastoma Subtype with Distinct Epidemiology and Superior Prognosis. // Neuro-Oncology. – 2009. – V. 11. – P. 833–841. – doi:10.1215/15228517-2008-123.

23. Al-Hussaini M. Histology of Primary Brain Tumors. In Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors // Lichtor T. Ed., InTech. – 2013. – ISBN 978-953-51-1058-3.
24. <https://www.atlasantibodies.com/blog/glioma-classification-and-key-molecular-pathology> // Интернет-ресурс.
25. Bhaduri A. , Di Lullo E. , Jung D. , Müller S. , Crouch E.E. , Espinosa C.S. , Ozawa T. , Alvarado B. , Spatazza J. , Cadwell C.R. , et al. Outer Radial Glia-like Cancer Stem Cells Contribute to Heterogeneity of Glioblastoma. // Cell Stem Cell. – 2020. – V. 26. – P. 48-63.e6. – doi:10.1016/j.stem.2019.11.015.
26. Neftel C. , Laffy J. , Filbin M.G. , Hara T. , Shore M.E. , Rahme G.J. , Richman A.R. , Silverbush D. , Shaw M.L. , Hebert C.M. , et al. An Integrative Model of Cellular States Plasticity and Genetics for Glioblastoma. // Cell. – 2019. – V. 178. – P. 835-849.e21. – doi:10.1016/j.cell.2019.06.024.
27. Gill B.J. , Pisapia D.J. , Malone H.R. , Goldstein H. , Lei L. , Sonabend A. , Yun J. , Samanamud J. , Sims J.S. , Banu M. , et al. MRI-Localized Biopsies Reveal Subtype-Specific Differences in Molecular and Cellular Composition at the Margins of Glioblastoma. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2014. – V. 111. –P. 12550–12555. – doi:10.1073/pnas.1405839111.
28. Francis J.M. , Zhang C.-Z. , Maire C.L. , Jung J. , Manzo V.E. , Adalsteinsson V.A. , Homer H. , Haidar S. , Blumenstiel B. , Pedamallu C.S. , et al. EGFR Variant Heterogeneity in Glioblastoma Resolved through Single-Nucleus Sequencing. // Cancer Discovery. – 2014. – V. 4. – P. 956–971. – doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0879.
29. Lee M. , Kang S.Y. , Suh Y.-L. Genetic Alterations of Epidermal Growth Factor Receptor in Glioblastoma: The Usefulness of Immunohistochemistry. // Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. – 2019. – V. 27. – P. 589–598. – doi:10.1097/PAI.0000000000000669.
30. Mitchell K. , Troike K. , Silver D.J. , Lathia J.D. The Evolution of the Cancer Stem Cell State in Glioblastoma: Emerging Insights into the next Generation of Functional Interactions. // Neuro-Oncology. –2021. – V. 23. – P. 199–213. – doi:10.1093/neuonc/noaa259.
31. Bradshaw A. , Wickremsekera A. , Tan S.T. , Peng L. , Davis P.F. , Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. // Front. Surg. – 2016. – V. 3. – doi:10.3389/fsurg.2016.00021.
32. Hassn Mesrati M. , Behrooz A.B. , Y. Abuhamad A. , Syahir A. Understanding Glioblastoma Biomarkers: Knocking a Mountain with a Hammer. // Cells .– 2020. – V. 9. – P. 1236. – doi:10.3390/cells9051236.

33. Chen H.-M. , Nikolic A. , Singhal D. , Gallo M. Roles of Chromatin Remodelling and Molecular Heterogeneity in Therapy Resistance in Glioblastoma. // *Cancers*. – 2022. – V. 14. – P. 4942. –doi:10.3390/cancers14194942.
34. Arifianto M.R. , Meizikri R. , Haq I.B.I. , Susilo R.I. , Wahyuhadi J. , Hermanto Y. , Faried A. Emerging Hallmark of Gliomas Microenvironment in Evading Immunity: A Basic Concept. // *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg*. – 2023. – V. 59. – P. 47. – doi:10.1186/s41983-023-00635-5.
35. Rodriguez D, Watts D, Gaete D, Sormendi S, Wielockx B. Hypoxia Pathway Proteins and Their Impact on the Blood Vasculature. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – № 17. – P. 9191. –doi.org/10.3390/ijms22179191
36. Xie T.-X. , Xia Z. , Zhang N. , Gong W. , Huang S. Constitutive NF-KappaB Activity Regulates the Expression of VEGF and IL-8 and Tumor Angiogenesis of Human Glioblastoma. // *Oncol Rep*. – 2010. – V. 23. – P. 725–732.
37. Tu J. , Fang Y. , Han D. , Tan X. , Jiang H. , Gong X. , Wang X. , Hong W. , Wei W. Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B in the Angiogenesis of Glioma: Insights into the Associated Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. // *Cell Proliferation*. – 2021. – V. 54. – P. e12929. – doi:10.1111/cpr.12929.
38. Chermnykh E. , Kalabusheva E. , Vorotelyak E. Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate. // *IJMS*. – 2018. – V. 19. – P. 1003. – doi:10.3390/ijms19041003.
39. Brennan C. , Momota H. , Hambardzumyan D. , Ozawa T. , Tandon A. , Pedraza A. , Holland E. Glioblastoma Subclasses Can Be Defined by Activity among Signal Transduction Pathways and Associated Genomic Alterations. // *PLoS ONE*. – 2009. –V. 4. – P. e7752. – doi:10.1371/journal.pone.0007752.
40. Hvinden I.C. , Cadoux-Hudson T. , Schofield C.J. , McCullagh J.S.O. Metabolic Adaptations in Cancers Expressing Isocitrate Dehydrogenase Mutations. // *Cell Reports Medicine*. – 2021. – V. 2. – P. 100469. –doi:10.1016/j.xcrm.2021.100469.
41. Xu X. , Zhao J. , Xu Z. , Peng B. , Huang Q. , Arnold E. , Ding J. Structures of Human Cytosolic NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Reveal a Novel Self-Regulatory Mechanism of Activity. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – P. 33946–33957. – doi:10.1074/jbc.M404298200.
42. Yan H. , Bigner D.D. , Velculescu V. , Parsons D.W. Mutant Metabolic Enzymes Are at the Origin of Gliomas. // *Cancer Research*. – 2009. – V. 69. – P. 9157–9159. – doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2650.

43. Jiang S. , Zanzazi G.J. , Hassanpour S. Predicting Prognosis and IDH Mutation Status for Patients with Lower-Grade Gliomas Using Whole Slide Images. // *Sci Rep.* – 2021. – V. 11. – P. 16849. – doi:10.1038/s41598-021-95948-x.
44. Yu W. , Zhang L. , Wei Q. , Shao A. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. // *Front. Oncol.* – 2020. – V. 9. – P. 1547. –doi:10.3389/fonc.2019.01547.
45. Alnahhas I. , Alsawas M. , Rayi A. , Palmer J.D. , Raval R. , Ong S. , Giglio P. , Murad M.H. , Pudevalli V. Characterizing Benefit from Temozolomide in MGMT Promoter Unmethylated and Methylated Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. // *Neuro-Oncology Advances.* – 2020 . – V. 2. – P. vdaa082. – doi:10.1093/noajnl/vdaa082.
46. Bell E.H. , Zhang P. , Fisher B.J. , Macdonald D.R. , McElroy J.P. , Lesser G.J. , Fleming J. , Chakraborty A.R. , Liu Z. , Becker A.P. , et al. Association of MGMT Promoter Methylation Status With Survival Outcomes in Patients With High-Risk Glioma Treated With Radiotherapy and Temozolomide: An Analysis From the NRG Oncology/RTOG 0424 Trial. // *JAMA Oncol.* – 2018. – V. 4. – P. 1405. –doi:10.1001/jamaoncol.2018.1977.
47. Verhaak R.G.W. , Hoadley K.A. , Purdom E. , Wang V. , Qi Y. , Wilkerson M.D. , Miller C.R. , Ding L. , Golub T. , Mesirov J.P. , et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA IDH1 EGFR and NF1. // *Cancer Cell.* – 2010. – V. 17. – P. 98–110. – doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
48. Park J. , Shim J.-K. , Yoon S.-J. , Kim S.H. , Chang J.H. , Kang S.-G. Transcriptome Profiling-Based Identification of Prognostic Subtypes and Multi-Omics Signatures of Glioblastoma. // *Sci Rep.* – 2019. – V. 9. – P. 10555. – doi:10.1038/s41598-019-47066-y.
49. Zakaria J. , Prabhu V.C. , Department of Neurological Surgery Loyola University Medical Center/Stritch School of Medicine Maywood IL USA Cortical Mapping in the Resection of Malignant Cerebral Gliomas.// In *Glioblastoma* , Department of Neurosurgery University Hospitals Leuven Leuven Belgium De Vleeschouwer S. Eds. , Codon Publications. – 2017 .– P. 263–280. –ISBN 978-0-9944381-2-6.
50. Brown T.J. , Brennan M.C. , Li M. , Church E.W. , Brandmeir N.J. , Rakszawski K.L. , Patel A.S. , Rizk E.B. , Suki D. , Sawaya R. , et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. // *JAMA Oncol.* – 2016. – V. 2. – P. 1460. –doi:10.1001/jamaoncol.2016.1373.
51. Verburg N. , de Witt Hamer P.C. State-of-the-Art Imaging for Glioma Surgery. // *Neurosurg Rev.* – 2021. – V. 44. – P. 1331–1343. – doi:10.1007/s10143-020-01337-9.

52. Liu C.J. , Shamsan G.A. , Akkin T. , Odde D.J. Glioma Cell Migration Dynamics in Brain Tissue Assessed by Multimodal Optical Imaging. // *Biophysical Journal* . – 2019. – V. 117. – P. 1179–1188. – doi:10.1016/j.bpj.2019.08.010.
53. Liu W. , Chen B. , Zheng H. , Xing Y. , Chen G. , Zhou P. , Qian L. , Min Y. Advances of Nanomedicine in Radiotherapy. // *Pharmaceutics*. – 2021. – V. 13. – P. 1757. – doi:10.3390/pharmaceutics13111757.
54. Rackwitz T. , Debus J. Clinical Applications of Proton and Carbon Ion Therapy. // *Seminars in Oncology*. – 2019. – V. 46. – P. 226–232. – doi:10.1053/j.seminoncol.2019.07.005.
55. Liu Y. , Liu Y. , Sun C. , Gan L. , Zhang L. , Mao A. , Du Y. , Zhou R. , Zhang H. Correction: Carbon Ion Radiation Inhibits Glioma and Endothelial Cell Migration Induced by Secreted VEGF. // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – P. e0135508. – doi:10.1371/journal.pone.0135508.
56. De Oliveira Rosario L.V. , Da Rosa B.G. , Goncalves T.L. , Matias D.I.L. , Freitas C. , Ferrer V.P. Glioblastoma Factors Increase the Migration of Human Brain Endothelial Cells In Vitro by Increasing MMP-9/CXCR4 Levels. // *Anticancer Res*. – 2020. – V. 40. – P. 2725–2737. – doi:10.21873/anticancer.14244.
57. Reid J.M. , Stevens D.C. , Rubin J. , Ames M.M. Pharmacokinetics of 3-Methyl-(Triazen-1-Yl)Imidazole-4-Carboximide Following Administration of Temozolomide to Patients with Advanced Cancer. // *Clin Cancer Res*. – 1997. – V. 3. – P. 2393–2398.
58. Ma M., Kong L., Du Z., Xie Z., Chen L., Chen R., Li Z., Liu J., Li Z., Hao A. A Novel Stimulus-Responsive Temozolomide Supramolecular Vesicle Based on Host–Guest Recognition. // *Colloid Polym Sci*. – 2019. – V. 297. – P. 261–269. – doi:10.1007/s00396-018-04461-7.
59. Mojas N. , Lopes M. , Jiricny J. Mismatch Repair-Dependent Processing of Methylation Damage Gives Rise to Persistent Single-Stranded Gaps in Newly Replicated DNA. // *Genes Dev*. – 2007. – V. 21. – P. 3342–3355. – doi:10.1101/gad.455407.
60. Solimando D.A. , Waddell J.A. Procarbazine Lomustine and Vincristine (PCV) Regimen for Central Nervous System Tumors. // *Hosp Pharm*. – 2017. – V. 52. – P. 98–104. – doi:10.1310/hpj5202-98.
61. Fischhaber P.L. , Gall A.S. , Duncan J.A. , Hopkins P.B. Direct Demonstration in Synthetic Oligonucleotides That N N'-Bis(2-Chloroethyl)-Nitrosourea Cross Links N1 of Deoxyguanosine to N3 of Deoxycytidine on Opposite Strands of Duplex DNA. // *Cancer Res*. – 1999. – V. 59. – P. 4363–4368.
62. Moudi M. , Go R. , Yien C.Y.S. , Nazre M. Vinca Alkaloids. // *Int J Prev Med*. – 2013. – V. 4. – P. 1231–1235.

63. Martino E. , Casamassima G. , Castiglione S. , Cellupica E. , Pantalone S. , Papagni F. , Rui M. , Siciliano A.M. , Collina S. Vinca Alkaloids and Analogues as Anti-Cancer Agents: Looking Back Peering Ahead. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – V. 28. – P. 2816–2826. –doi:10.1016/j.bmcl.2018.06.044.
64. Blonski M. , Obara T. , Brzenczek C. , Pouget C. , Dillier C. , Meyer M. , Lavigne L. , Forthoffer N. , Broussois A. , Gauchotte G. , et al. Initial PCV Chemotherapy Followed by Radiotherapy Is Associated With a Prolonged Response But Late Neurotoxicity in 20 Diffuse Low-Grade Glioma Patients. // *Front. Oncol.* –2022. – V. 12. – P.827897. – doi:10.3389/fonc.2022.827897.
65. Rocha Pinheiro S.L. , Lemos F.F.B. , Marques H.S. , Silva Luz M. , De Oliveira Silva L.G. , Faria Souza Mendes Dos Santos C. , Da Costa Evangelista K. , Calmon M.S. , Sande Loureiro M. , Freire De Melo F. Immunotherapy in Glioblastoma Treatment: Current State and Future Prospects. // *World J Clin Oncol.* –2023. – V. 14. – P. 138–159 – doi:10.5306/wjco.v14.i4.138.
66. Lim M., Xia Y., Bettegowda C., Weller, M. Current State of Immunotherapy for Glioblastoma. // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2018. – V. 15. – P. 422–442. – doi:10.1038/s41571-018-0003-5.
67. Yang T. , Kong Z. , Ma W. PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors in Glioblastoma: Clinical Studies Challenges and Potential. // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2021. – V. 17. – P. 546–553. –doi:10.1080/21645515.2020.1782692.
68. Vimalathas G. , Kristensen B.W. Expression Prognostic Significance and Therapeutic Implications of PD-L1 in Gliomas. // *Neuropathology Appl Neurobio.* – 2022. – V. 48. – P. e12767. – doi:10.1111/nan.12767.
69. Pu Y. , Ji Q. Tumor-Associated Macrophages Regulate PD-1/PD-L1 Immunosuppression. // *Front. Immunol.* – 2022. – V. 13. – P. 874589. – doi:10.3389/fimmu.2022.874589.
70. Van Coillie S. , Wiernicki B. , Xu J. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. // *In Regulation of Cancer Immune Checkpoints* , Xu J. Ed. , *Advances in Experimental Medicine and Biology* , Springer Singapore: Singapore. – 2020. – V. 1248. – P. 7–32 –ISBN 9789811532658.
71. Ghouzlani A. , Kandoussi S. , Tall M. , Reddy K.P. , Rafii S. , Badou A. Immune Checkpoint Inhibitors in Human Glioma Microenvironment. // *Front. Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 679425. –doi:10.3389/fimmu.2021.679425.
72. Felsberg J. , Hentschel B. , Kaulich K. , Gramatzki D. , Zacher A. , Malzkorn B. , Kamp M. , Sabel M. , Simon M. , Westphal M. , et al. Epidermal Growth Factor Receptor



Variant III (EGFRvIII) Positivity in EGFR -Amplified Glioblastomas: Prognostic Role and Comparison between Primary and Recurrent Tumors. // *Clin Cancer Res*. – 2017. – V. 23. – P. 6846–6855. – doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0890.

73. Schuster J. , Lai R.K. , Recht L.D. , Reardon D.A. , Paleologos N.A. , Groves M.D. , Mrugala M.M. , Jensen R. , Baehring J.M. , Sloan A. , et al. A Phase II Multicenter Trial of Rindopepimut (CDX-110) in Newly Diagnosed Glioblastoma: The ACT III Study. // *Neuro-Oncology*. – 2015. – V. 17. – P. 854–861. – doi:10.1093/neuonc/nou348.

74. Weller M. , Butowski N. , Tran D.D. , Recht L.D. , Lim M. , Hirte H. , Ashby L. , Mechtler L. , Goldlust S.A. , Iwamoto F. , et al. Rindopepimut with Temozolomide for Patients with Newly Diagnosed EGFRvIII-Expressing Glioblastoma (ACT IV): A Randomised Double-Blind International Phase 3 Trial. // *The Lancet Oncology*. – 2017. – V. 18. – P. 1373–1385. – doi:10.1016/S1470-2045(17)30517-X.

75. Platten M. , Bunse L. , Wick A. , Bunse T. , Le Cornet L. , Harting I. , Sahm F. , Sanghvi K. , Tan C.L. , Poschke I. , et al. A Vaccine Targeting Mutant IDH1 in Newly Diagnosed Glioma. // *Nature*. – 2021. – V. 592. – P. 463–468. – doi:10.1038/s41586-021-03363-z.

76. Mohan A. , Peters K. , Hotchkiss K. , Batich K. , Congdon K. , Vlahovic G. , Archer G. , Norberg P. , Xie W. , Herndon J. , et al. IMMU-06. Targeting IDH1 mutant grade ii recurrent gliomas using a peptide vaccination strategy. // *Neuro-Oncology Advances*. – 2021. – V. 3. – P. iv5–iv6. –doi:10.1093/noajnl/vdab112.019.

77. Lazarus H.M. , Ragsdale C.E. , Gale R.P. , Lyman G.H. Sargramostim (Rhu GM-CSF) as Cancer Therapy (Systematic Review) and An Immunomodulator. A Drug Before Its Time? // *Front. Immunol.* – 2021 – V. 12 – P. 706186 – doi:10.3389/fimmu.2021.706186.

78. Hercus T.R. , Thomas D. , Guthridge M.A. , Ekert P.G. , King-Scott J. , Parker M.W. , Lopez A.F. The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor: Linking Its Structure to Cell Signaling and Its Role in Disease. // *Blood*. – 2009. – V. 114. – P. 1289–1298. – doi:10.1182/blood-2008-12-164004.

79. Jean W.C. , Spellman S.R. , Wallenfriedman M.A. , Flores C.T. , Kurtz B.P. , Hall W.A. , Low W.C. Effects of Combined Granulocyte–Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Interleukin-2 and Interleukin-12 Based Immunotherapy against Intracranial Glioma in the Rat. // *J Neurooncol.* – 2004. – V. 66. – P. 39–49. – doi:10.1023/B:NEON.0000013477.94568.0f.

80. Agarwalla P. , Barnard Z. , Fecci P. , Dranoff G. , Curry W.T. Sequential Immunotherapy by Vaccination With GM-CSF–Expressing Glioma Cells and CTLA-4 Blockade

Effectively Treats Established Murine Intracranial Tumors. // *Journal of Immunotherapy*. – 2012. – V. 35. – P. 385–389. – doi:10.1097/CJI.0b013e3182562d59.

81. Mueller M.M. , Herold-Mende C.C. , Riede D. , Lange M. , Steiner H.-H. , Fusenig N.E. Autocrine Growth Regulation by Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Gliomas with Tumor Progression. // *The American Journal of Pathology*. – 1999. – V. 155. – P.1557–1567. – doi:10.1016/S0002-9440(10)65472-7.

82. Gutschalk C.M. , Herold-Mende C.C. , Fusenig N.E. , Mueller M.M. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Promote Malignant Growth of Cells from Head and Neck Squamous Cell Carcinomas In Vivo. // *Cancer Research*. – 2006. – V. 66. – P. 8026–8036. – doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0158.

83. Yin X. , Chen S. , Eisenbarth S.C. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2021. – V. 39. – P. 759–790. – doi:10.1146/annurev-immunol-101819-025146.

84. Schaller T.H. , Sampson J.H. Advances and Challenges: Dendritic Cell Vaccination Strategies for Glioblastoma. // *Expert Review of Vaccines*. – 2017. – V. 16. – P. 27–36. – doi:10.1080/14760584.2016.1218762.

85. Parney I.F. , Chang L.-J. , Farr-Jones M.A. , Hao C. , Smylie M. , Petruk K.C. Technical Hurdles in a Pilot Clinical Trial of Combined B7-2 and GM-CSF Immunogene Therapy for Glioblastomas and Melanomas. // *J Neurooncol.* – 2006. – V. 78. – P. 71–80. – doi:10.1007/s11060-005-9058-0.

86. Kelly E. , Russell S.J. History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering. // *Molecular Therapy*. – 2007. – V. 15. – P. 651–659. – doi:10.1038/sj.mt.6300108.

87. П. М. Чумаков , С.В. Нетесов. Вирусы Атакуют Опухоль. // *Наука из первых рук*. – 2013 – С. 76–86.

88. Martuza R.L. , Malick A. , Markert J.M. , Ruffner K.L. , Coen D.M. Experimental Therapy of Human Glioma by Means of a Genetically Engineered Virus Mutant. // *Science*. – 1991. – V. 252. – P. 854–856 . – doi:10.1126/science.1851332.

89. Banerjee K. , Núñez F.J. , Haase S. , McClellan B.L. , Faisal S.M. , Carney S.V. , Yu J. , Alghamri M.S. , Asad A.S. , Candia A.J.N. , et al. Current Approaches for Glioma Gene Therapy and Virotherapy. // *Front. Mol. Neurosci.* – 2021. – V. 14. – P. 621831. – doi:10.3389/fnmol.2021.621831.

90. Koch M. , Lawler S. , Chiocca E. HSV-1 Oncolytic Viruses from Bench to Bedside: An Overview of Current Clinical Trials. // *Cancers*. – 2020. – V. 12. – P. 3514. – doi:10.3390/cancers12123514.

91. Conry R.M. , Westbrook B. , McKee S. , Norwood T.G. Talimogene Laherparepvec: First in Class Oncolytic Virotherapy. // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2018. – V. 14. – P. 839–846. –doi:10.1080/21645515.2017.1412896.
92. Cinatl J. , Michaelis M. , Driever P.H. , Cinatl J. , Hrabeta J. , Suhan T. , Wilhelm Doerr H. , Vogel J.-U. Multimutated Herpes Simplex Virus G207 Is a Potent Inhibitor of Angiogenesis. // *Neoplasia*. – 2004. – V. 6. – P. 725–735. – doi:10.1593/neo.04265.
93. Markert J.M. , Medlock M.D. , Rabkin S.D. , Gillespie G.Y. , Todo T. , Hunter W.D. , Palmer C.A. , Feigenbaum F. , Tornatore C. , Tufaro F. , et al. Conditionally Replicating Herpes Simplex Virus Mutant G207 for the Treatment of Malignant Glioma: Results of a Phase I Trial. // *Gene Ther.* – 2000. – V. 7. – P. 867–874. – doi:10.1038/sj.gt.3301205.
94. Markert J.M. , Liechty P.G. , Wang W. , Gaston S. , Braz E. , Karrasch M. , Nabors L.B. , Markiewicz M. , Lakeman A.D. , Palmer C.A. , et al. Phase Ib Trial of Mutant Herpes Simplex Virus G207 Inoculated Pre-and Post-Tumor Resection for Recurrent GBM. // *Molecular Therapy*. – 2009. – V. 17. – P. 199–207. – doi:10.1038/mt.2008.228.
95. Markert J.M. , Razdan S.N. , Kuo H.-C. , Cantor A. , Knoll A. , Karrasch M. , Nabors L.B. , Markiewicz M. , Agee B.S. , Coleman J.M. , et al. A Phase I Trial of Oncolytic HSV-1 G207 Given in Combination With Radiation for Recurrent GBM Demonstrates Safety and Radiographic Responses. // *Molecular Therapy*. – 2014. – V. 22. – P. 1048–1055. – doi:10.1038/mt.2014.22.
96. Todo T. ATIM-14. RESULTS OF PHASE II CLINICAL TRIAL OF ONCOLYTIC HERPES VIRUS G47 $\Delta$  IN PATIENTS WITH GLIOBLASTOMA. // *Neuro-Oncology*. – 2019. – V. 21. – P. vi4–vi4. – doi:10.1093/neuonc/noz175.014.
97. Sugawara K. , Iwai M. , Ito H. , Tanaka M. , Seto Y. , Todo T. Oncolytic Herpes Virus G47 $\Delta$  Works Synergistically with CTLA-4 Inhibition via Dynamic Intratumoral Immune Modulation. // *Molecular Therapy - Oncolytics* . – 2021. – V. 22. – P. 129–142. – doi:10.1016/j.omto.2021.05.004.
98. Zhao Y. , Liu Z. , Li L. , Wu J. , Zhang H. , Zhang H. , Lei T. , Xu B. Oncolytic Adenovirus: Prospects for Cancer Immunotherapy. // *Front. Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 707290. – doi:10.3389/fmicb.2021.707290.
99. Garber K. China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment. // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2006. – V. 98. – P. 298–300. – doi:10.1093/jnci/djj111.
100. Geoerger B. , Grill J. , Opolon P. , Morizet J. , Aubert G. , Terrier-Lacombe M.-J. , Bressac De-Paillerets B. , Barrois M. , Feunteun J. , Kirn D.H. , et al. Oncolytic Activity of

the E1B-55 KDa-Deleted Adenovirus ONYX-015 Is Independent of Cellular P53 Status in Human Malignant Glioma Xenografts. // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – P. 764–772.

101. Fueyo J. , Gomez-Manzano C. , Alemany R. , Lee P.S. , McDonnell T.J. , Mitlianga P. , Shi Y.-X. , Levin V.A. , Yung W.K.A. , Kyritsis A.P. A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect in Vivo. // *Oncogene.* – 2000. – V. 19. – P. 2–12. – doi:10.1038/sj.onc.1203251.

102. Suzuki K. , Fueyo J. , Krasnykh V. , Reynolds P.N. , Curiel D.T. , Alemany R. A Conditionally Replicative Adenovirus with Enhanced Infectivity Shows Improved Oncolytic Potency. // *Clin Cancer Res.* – 2001. – V. 7. – P. 120–126.

103. Mantwill K. , Klein F.G. , Wang D. , Hindupur S.V. , Ehrenfeld M. , Holm P.S. , Nawroth R. Concepts in Oncolytic Adenovirus Therapy. // *IJMS.* – 2021. – V. 22. – P. 10522. – doi:10.3390/ijms221910522.

104. Rojas J.J. , Cascallo M. , Guedan S. , Gros A. , Martinez-Quintanilla J. , Hemminki A. , Alemany R. A Modified E2F-1 Promoter Improves the Efficacy to Toxicity Ratio of Oncolytic Adenoviruses. // *Gene Ther.* – 2009. – V. 16. – P. 1441–1451. – doi:10.1038/gt.2009.103.

105. Barrett J.A. , Cai H. , Miao J. , Khare P.D. , Gonzalez P. , Dalsing-Hernandez J. , Sharma G. , Chan T. , Cooper L.J.N. , Lebel F. Regulated Intratumoral Expression of IL-12 Using a RheoSwitch Therapeutic System® (RTS®) Gene Switch as Gene Therapy for the Treatment of Glioma. // *Cancer Gene Ther.* – 2018. – V. 25. – P. 106–116. – doi:10.1038/s41417-018-0019-0.

106. Chiocca E.A. , Yu J.S. , Lukas R.V. , Solomon I.H. , Ligon K.L. , Nakashima H. , Triggs D.A. , Reardon D.A. , Wen P. , Stopa B.M. , et al. Regulatable Interleukin-12 Gene Therapy in Patients with Recurrent High-Grade Glioma: Results of a Phase 1 Trial. // *Sci. Transl. Med.* – 2019. – V. 11. – P. eaaw5680. – doi:10.1126/scitranslmed.aaw5680.

107. Bretscher C. , Marchini A. H-1 Parvovirus as a Cancer-Killing Agent: Past Present and Future. // *Viruses.* – 2019. – V. 11. – P. 562. – doi:10.3390/v11060562.

108. Di Piazza M. , Mader C. , Geletneky K. , Herrero Y Calle M. , Weber E. , Schlehofer J. , Deleu L. , Rommelaere J. Cytosolic Activation of Cathepsins Mediates Parvovirus H-1-Induced Killing of Cisplatin and TRAIL-Resistant Glioma Cells. // *J Virol.* – 2007. – V. 81. – P. 4186–4198. – doi:10.1128/JVI.02601-06.

109. Geletneky K. , Hajda J. , Angelova A.L. , Leuchs B. , Capper D. , Bartsch A.J. , Neumann J.-O. , Schöning T. , Hüsing J. , Beelte B. , et al. Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial. // *Molecular Therapy.* – 2017. – V. 25. – P. 2620–2634. – doi:10.1016/j.ymthe.2017.08.016.

110. Angelova A. , Barf M. , Geletneky K. , Unterberg A. , Rommelaere J. Immunotherapeutic Potential of Oncolytic H-1 Parvovirus: Hints of Glioblastoma Microenvironment Conversion towards Immunogenicity. // *Viruses*. – 2017. – V. 9. – P. 382. – doi:10.3390/v9120382.
111. Schirmacher V. Molecular Mechanisms of Anti-Neoplastic and Immune Stimulatory Properties of Oncolytic Newcastle Disease Virus. // *Biomedicines*. – 2022. – V. 10. –P. 562. –doi:10.3390/biomedicines10030562.
112. Koks C.A. , Garg A.D. , Ehrhardt M. , Riva M. , Vandenberg L. , Boon L. , Vleeschouwer S.D. , Agostinis P. , Graf N. , Van Gool S.W. Newcastle Disease Virotherapy Induces Long-term Survival and Tumor-specific Immune Memory in Orthotopic Glioma through the Induction of Immunogenic Cell Death. // *Int. J. Cancer*. – 2015. – V. 136. – doi:10.1002/ijc.29202.
113. Bai Y. , Chen Y. , Hong X. , Liu X. , Su X. , Li S. , Dong X. , Zhao G. , Li Y. Newcastle Disease Virus Enhances the Growth-Inhibiting and Proapoptotic Effects of Temozolomide on Glioblastoma Cells in Vitro and in Vivo. // *Sci Rep* .– 2018. – V. 8. – P. 11470. – doi:10.1038/s41598-018-29929-y.
114. Csatory L.K. , Gosztonyi G. , Szeberenyi J. , Fabian Z. , Liszka V. , Bodey B. , Csatory C.M. MTH-68/H Oncolytic Viral Treatment in Human High-Grade Gliomas. // *J Neurooncol*. –2004. – V. 67. – P. 83—93. doi:10.1023/B:NEON.0000021735.85511.05.
115. Freeman A.I. , Zakay-Rones Z. , Gomori J.M. , Linetsky E. , Rasooly L. , Greenbaum E. , Rozenman-Yair S. , Panet A. , Libson E. , Irving C.S. , et al. Phase I/II Trial of Intravenous NDV-HUJ Oncolytic Virus in Recurrent Glioblastoma Multiforme.// *Molecular Therapy*. – 2006. – V. 13. – P. 221–228. – doi:10.1016/j.ymthe.2005.08.016.
116. Thorne S. , Bartlett D. , Kirn D. The Use of Oncolytic Vaccinia Viruses in the Treatment of Cancer: A New Role for an Old Ally? // *CGT*. – 2005. – V. 5. – P. 429–443. – doi:10.2174/1566523054546215.
117. Abd-Aziz N. , Poh C.L. Development of Oncolytic Viruses for Cancer Therapy. // *Translational Research* .– 2021. – V. 237. – P. 98–123. – doi:10.1016/j.trsl.2021.04.008.
118. Beerli C. , Yakimovich A. , Kilcher S. , Reynoso G.V. , Fläschner G. , Müller D.J. , Hickman H.D. , Mercer J. Vaccinia Virus Hijacks EGFR Signalling to Enhance Virus Spread through Rapid and Directed Infected Cell Motility. // *Nat Microbiol* .– 2018. –V. 4. – P. 216–225. – doi:10.1038/s41564-018-0288-2.
119. Samson A. , West E.J. , Carmichael J. , Scott K.J. , Turnbull S. , Kuszlewicz B. , Dave R.V. , Peckham-Cooper A. , Tidswell E. , Kingston J. , et al. Neoadjuvant Intravenous

Oncolytic Vaccinia Virus Therapy Promotes Anticancer Immunity in Patients. // *Cancer Immunology Research*. – 2022. – V. 10. – P. 745–756. – doi:10.1158/2326-6066.CIR-21-0171.

120. Timiryasova T.M. , Li J. , Chen B. , Chong D. , Langridge W.H. , Gridley D.S. , Fodor I. Antitumor Effect of Vaccinia Virus in Glioma Model. // *Oncol Res*. – 1999. – V. 11. – P. 133–144.

121. Chen B. , Timiryasova T.M. , Andres M.L. , Kajioka E.H. , Dutta-Roy R. , Gridley D.S. , Fodor I. Evaluation of Combined Vaccinia Virus–Mediated Antitumor Gene Therapy with P53 IL-2 and IL-12 in a Glioma Model. // *Cancer Gene Ther*. – 2000. – V. 7. – P. 1437–1447. – doi:10.1038/sj.cgt.7700252.

122. Kochneva G. , Sivolobova G. , Tkacheva A. , Grazhdantseva A. , Troitskaya O. , Nushtaeva A. , Tkachenko A. , Kuligina E. , Richter V. , Koval O. Engineering of Double Recombinant Vaccinia Virus with Enhanced Oncolytic Potential for Solid Tumor Virotherapy. // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7. – P. 74171–74188. – doi:10.18632/oncotarget.12367.

123. А. С. Фомин , О. А. Коваль , Д. В. Семенов , М. О. Потапенко , Е. В. Кулигина , Ю. Я. Кит , В. А. Рихтер. Анализ биохимических маркеров апоптоза клеток mcf-7 индуцируемого рекомбинантным аналогом противоопухолевого пептида лактапина. // *Биоорганическая химия*. – 2012. – № 38. – 1–7.

124. Kolyasnikova N.M. , Pestov N.B. , Sanchez-Pimentel J.P. , Barlev N.A. , Ishmukhametov A.A. Anti-Cancer Virotherapy in Russia: Lessons from the Past Current Challenges and Prospects for the Future. // *CPB*. – 2023. – V. 24. – P. 266–278. – doi:10.2174/1389201023666220516121813.

125. Chumakov P.M. , Morozova V.V. , Babkin I.V. , Baikov I.K. , Netesov S.V. , Tikunova N.V. Oncolytic Enteroviruses. // *Mol Biol*. – 2012. – V. 46. – P. 639–650. – doi:10.1134/S0026893312050032.

126. Soboleva A.V. , Seriak Daria , Gabdrakhmanova A.F. , Sosnovtseva Anastasiia , Tkhe L.H. , Kochetkov D.V. , Ilyinskaya G.V. , Golbin D.A. , Lipatova Anastasia , Chumakov Peter. Glioblastoma Multiforme Stem Cells Are Highly Sensitive to Some Human Non-Pathogenic Enteroviruses. // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2018. – P. 936–939.

127. Sidorenko A.S. , Zheltukhin A.O. , Soboleva A.V. , Lipatova A.V. , et al. Persistence of Oncolytic Coxsackie Virus A7 in Subcutaneous Human Glioblastoma Xenografts in Mice in the Context of Experimental Therapy. // *BRSMU*. – 2018. – P. 41–46. – doi:10.24075/brsmu.2018.032.

128. Sosnovtseva A.O. , Zheltukhin A.O. , Lipatova A.V. , Chumakov P.M. , Chekhonin V.P. Oncolytic Activity of the Vaccine Strain of Type 3 Poliovirus on the Model of

Rat Glioma C6 Cells. // Bull Exp Biol Med. – 2019. – V. 167. – P. 111–115. – doi:10.1007/s10517-019-04472-6.

129. Romanenko M.V. , Dolgova E.V. , Osipov I.D. , Ritter G.S. , Sizova M.S. , Proskurina A.S. , Efremov Y.R. , Bayborodin S.I. , Potter E.A. , Taranov O.S. , et al. Oncolytic Effect of Adenoviruses Serotypes 5 and 6 Against U87 Glioblastoma Cancer Stem Cells. // Anticancer Res. – 2019. – V. 39. – P. 6073–6086. – doi:10.21873/anticancer.13815.

130. Stepanenko A.A. , Sosnovtseva A.O. , Valikhov M.P. , Chernysheva A.A. , Cherepanov S.A. , Yusubalieva G.M. , Ruzsics Z. , Lipatova A.V. , Chekhonin V.P. Superior Infectivity of the Fiber Chimeric Oncolytic Adenoviruses Ad5/35 and Ad5/3 over Ad5-Delta-24-RGD in Primary Glioma Cultures. // Molecular Therapy - Oncolytics. – 2022. – V. 24. – P. 230–248. – doi:10.1016/j.omto.2021.12.013.

131. Kochneva G.V. , Babkina I.N. , Lupan T.A. , Grazhdantseva A.A. , Yudin P.V. , Sivolobova G.F. , Shvalov A.N. , Popov E.G. , Babkin I.V. , Netesov S.V. , et al. Apoptin Enhances the Oncolytic Activity of Vaccinia Virus in Vitro. // Mol Biol. – 2013. – V. 47. – P. 733–742. – doi:10.1134/S0026893313050075.

132. Tkacheva A.V. , Sivolobova G.F. , Grazhdantseva A.A. , Shevelev O.B. , Razumov I.A. , Zavjalov E.L. , Loktev V.B. , Kochneva G.V. Targeted Therapy of Human Glioblastoma Combining the Oncolytic Properties of Parvovirus H-1 and Attenuated Strains of the Vaccinia Virus. // Mol. Genet. Microbiol. Virol. – 2019. – V. 34. – P. 140–147. – doi:10.3103/S0891416819020101.

133. Ageenko A., Vasileva N., Richter V., Kuligina E. Combination of Oncolytic Virotherapy with Different Antitumor Approaches against Glioblastoma. // IJMS. – 2024. – V. 25. – P. 2042. – doi:10.3390/ijms25042042.

134. Suryawanshi Y.R. , Schulze A.J. Oncolytic Viruses for Malignant Glioma: On the Verge of Success? // Viruses. – 2021. – V. 13. – P. 1294. – doi:10.3390/v13071294.

135. Thomas R.J. , Bartee E. The Use of Oncolytic Virotherapy in the Neoadjuvant Setting. // J Immunother Cancer. – 2022. – V. 10. – P. e004462. – doi:10.1136/jitc-2021-004462.

136. Dymova M.A. , Kuligina E.V. , Richter V.A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. // IJMS. – 2021. – V. 22. – P. 6385. – doi:10.3390/ijms22126385.

137. Kanai R. , Rabkin S.D. , Yip S. , Sgubin D. , Zaupa C.M. , Hirose Y. , Louis D.N. , Wakimoto H. , Martuza R.L. Oncolytic Virus-Mediated Manipulation of DNA Damage Responses: Synergy With Chemotherapy in Killing Glioblastoma Stem Cells. // JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 2012. – V. 104. – P. 42–55. – doi:10.1093/jnci/djr509.

138. Neyns B. , Tosoni A. , Hwu W.-J. , Reardon D.A. Dose-Dense Temozolomide Regimens: Antitumor Activity Toxicity and Immunomodulatory Effects. // *Cancer*. – 2010. – V. 116. – P. 2868–2877. – doi:10.1002/cncr.25035.
139. Scurr M. , Pembroke T. , Bloom A. , Roberts D. , Thomson A. , Smart K. , Bridgeman H. , Adams R. , Brewster A. , Jones R. , et al. Low-Dose Cyclophosphamide Induces Antitumor T-Cell Responses Which Associate with Survival in Metastatic Colorectal Cancer. // *Clinical Cancer Research*. –2017. – V. 23. – P. 6771–6780. – doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0895.
140. Liikanen I. , Ahtiainen L. , Hirvinen M.L. , Bramante S. , Cerullo V. , Nokisalmi P. , Hemminki O. , Diaconu I. , Pesonen S. , Koski A. , et al. Oncolytic Adenovirus With Temozolomide Induces Autophagy and Antitumor Immune Responses in Cancer Patients. // *Molecular Therapy*. – 2013. – V. 21. – P. 1212–1223. – doi:10.1038/mt.2013.51.
141. Young B.A. , Spencer J.F. , Ying B. , Tollefson A.E. , Toth K. , Wold W.S.M. The Role of Cyclophosphamide in Enhancing Antitumor Efficacy of an Adenovirus Oncolytic Vector in Subcutaneous Syrian Hamster Tumors. // *Cancer Gene Ther*. – 2013. – V. 20. – P. 521–530. – doi:10.1038/cgt.2013.49.
142. Peng K.-W. , Myers R. , Greenslade A. , Mader E. , Greiner S. , Federspiel M.J. , Dispenzieri A. , Russell S.J. Using Clinically Approved Cyclophosphamide Regimens to Control the Humoral Immune Response to Oncolytic Viruses. // *Gene Ther*. – 2013. – V. 20. – P. 255–261. – doi:10.1038/gt.2012.31.
143. Gupta K. , Burns T.C. Radiation-Induced Alterations in the Recurrent Glioblastoma Microenvironment: Therapeutic Implications. // *Front. Oncol*. – 2018. – V. 8. – P. 503. – doi:10.3389/fonc.2018.00503.
144. Goel A. , Carlson S.K. , Classic K.L. , Greiner S. , Naik S. , Power A.T. , Bell J.C. , Russell S.J. Radioiodide Imaging and Radiovirotherapy of Multiple Myeloma Using VSV( $\Delta$ 51)-NIS an Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Encoding the Sodium Iodide Symporter Gene. // *Blood*. – 2007. – V. 110. – P. 2342–2350. – doi:10.1182/blood-2007-01-065573.
145. Galanis E. , Atherton P.J. , Maurer M.J. , Knutson K.L. , Dowdy S.C. , Cliby W.A. , Haluska P. , Long H.J. , Oberg A. , Aderca I. , et al. Oncolytic Measles Virus Expressing the Sodium Iodide Symporter to Treat Drug-Resistant Ovarian Cancer.// *Cancer Research*. – 2015. – V. 75. – P. 22–30. – doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2533.
146. Timiryasova T.M. , Gridley D.S. , Chen B. , Andres M.L. , Dutta-Roy R. , Miller G. , Bayeta E.J.M. , Fodor I. Radiation Enhances the Anti-Tumor Effects of Vaccinia-P53 Gene Therapy in Glioma. // *Technol Cancer Res Treat*. – 2003. – V. 2. – P. 223–235. – doi:10.1177/153303460300200306.



147. Gállego Pérez-Larraya J. , Garcia-Moure M. , Labiano S. , Patiño-García A. , Dobbs J. , Gonzalez-Huarriz M. , Zalacain M. , Marrodan L. , Martinez-Velez N. , Puigdelloses M. , et al. Oncolytic DNX-2401 Virus for Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. // *N Engl J Med.* – 2022. – V. 386. – P. 2471–2481. – doi:10.1056/NEJMoa2202028.
148. McGray A.J.R. , Huang R.-Y. , Battaglia S. , Eppolito C. , Miliotto A. , Stephenson K.B. , Lugade A.A. , Webster G. , Lichty B.D. , Seshadri M. , et al. Oncolytic Maraba Virus Armed with Tumor Antigen Boosts Vaccine Priming and Reveals Diverse Therapeutic Response Patterns When Combined with Checkpoint Blockade in Ovarian Cancer. // *j. immunotherapy cancer.* – 2019. – V. 7. – P. 189. –doi:10.1186/s40425-019-0641-x.
149. Wang G. , Kang X. , Chen K.S. , Jehng T. , Jones L. , Chen J. , Huang X.F. , Chen S.-Y. An Engineered Oncolytic Virus Expressing PD-L1 Inhibitors Activates Tumor Neoantigen-Specific T Cell Responses. // *Nat Commun.* – 2020. – V. 11. – P. 1395. – doi:10.1038/s41467-020-15229-5.
150. Liu Z. , Ravindranathan R. , Kalinski P. , Guo Z.S. , Bartlett D.L. Rational Combination of Oncolytic Vaccinia Virus and PD-L1 Blockade Works Synergistically to Enhance Therapeutic Efficacy. // *Nat Commun.* – 2017. – V. 8. – P. 14754. – doi:10.1038/ncomms14754.
151. Fan J. , Jiang H. , Cheng L. , Ma B. , Liu R. Oncolytic Herpes Simplex Virus and Temozolomide Synergistically Inhibit Breast Cancer Cell Tumorigenesis in Vitro and in Vivo. // *Oncol Lett.* – 2020. – V. 21. – P. 99. – doi:10.3892/ol.2020.12360.
152. Gomez-Gutierrez J.G. , Nitz J. , Sharma R. , Wechman S.L. , Riedinger E. , Martinez-Jaramillo E. , Sam Zhou H. , McMasters K.M. Combined Therapy of Oncolytic Adenovirus and Temozolomide Enhances Lung Cancer Virotherapy in Vitro and in Vivo. // *Virology.* – 2016. – V. 487. – P. 249–259. – doi:10.1016/j.virol.2015.10.019.
153. 829. Combining Oncolytic Herpes Simplex Virus and Chemotherapy: G47Δ and Temozolomide Synergize in Killing Glioma Stem Cells. // *Molecular Therapy.* – 2010. – V. 18. – P. S320. – doi:10.1016/S1525-0016(16)38270-3.
154. Saha D. , Rabkin S.D. , Martuza R.L. Temozolomide Antagonizes Oncolytic Immunovirotherapy in Glioblastoma. // *J Immunother Cancer.* – 2020. – V. 8. –P. e000345. – doi:10.1136/jitc-2019-000345.
155. Yamamura K. , Kasuya H. , Sahin T.T. , Tan G. , Hotta Y. , Tsurumaru N. , Fukuda S. , Kanda M. , Kobayashi D. , Tanaka C. , et al. Combination Treatment of Human Pancreatic Cancer Xenograft Models with the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Erlotinib and Oncolytic Herpes Simplex Virus HF10. // *Ann Surg Oncol.* – 2014. – V. 21. – P. 691–698. – doi:10.1245/s10434-013-3329-3.

156. Lun X. , Alain T. , Zemp F.J. , Zhou H. , Rahman M.M. , Hamilton M.G. , McFadden G. , Bell J. , Senger D.L. , Forsyth P.A. Myxoma Virus Virotherapy for Glioma in Immunocompetent Animal Models: Optimizing Administration Routes and Synergy with Rapamycin. // *Cancer Research*. – 2010. – V. 70. – P. 598–608 – doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1510.
157. Moon E.K. , Wang L.-C.S. , Bekdache K. , Lynn R.C. , Lo A. , Thorne S.H. , Albelda S.M. Intra-Tumoral Delivery of CXCL11 via a Vaccinia Virus but Not by Modified T Cells Enhances the Efficacy of Adoptive T Cell Therapy and Vaccines. // *OncoImmunology*. – 2018. – V. 7. –P. e1395997. – doi:10.1080/2162402X.2017.1395997.
158. Wing A. , Fajardo C.A. , Posey A.D. , Shaw C. , Da T. , Young R.M. , Alemany R. , June C.H. , Guedan S. Improving CART-Cell Therapy of Solid Tumors with Oncolytic Virus–Driven Production of a Bispecific T-Cell Engager. // *Cancer Immunology Research*. – 2018. – V. 6. – P. 605–616. – doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0314.
159. Chédeville A.L. , Madureira P.A. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Radiotherapy Resistance. // *Cancers*. – 2021. – V. 13. – P. 542. – doi:10.3390/cancers13030542.
160. Marampon F. , Gravina G.L. , Zani B.M. , Popov V.M. , Fratticci A. , Cerasani M. , Di Genova D. , Mancini M. , Ciccarelli C. , Ficorella C. , et al. Hypoxia Sustains Glioblastoma Radioresistance through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1 $\alpha$  Functional Interplay. // *International Journal of Oncology*. – 2014. – V. 44. – P. 2121–2131. – doi:10.3892/ijo.2014.2358.
161. Jamal M. , Rath B.H. , Tsang P.S. , Camphausen K. , Tofilon P.J. The Brain Microenvironment Preferentially Enhances the Radioresistance of CD133+ Glioblastoma Stem-like Cells. // *Neoplasia*. – 2012. – V. 14. – P. 150–158. – doi:10.1593/neo.111794.
162. Farace C. , Oliver J.A. , Melguizo C. , Alvarez P. , Bandiera P. , Rama A.R. , Malaguarnera G. , Ortiz R. , Madeddu R. , Prados J. Microenvironmental Modulation of Decorin and Lumican in Temozolomide-Resistant Glioblastoma and Neuroblastoma Cancer Stem-Like Cells. // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – P. e0134111. – doi:10.1371/journal.pone.0134111.
163. Liu Y. , Zhao Y. , Fang J. , Fang J. , Yuan X. Bioinformatics Analysis of Microenvironment-Related Genes Associated with Radioresistance in Glioblastoma. // *Transl Cancer Res TCR*. – 2020. – V. 9. – P. 7495–7504. – doi:10.21037/tcr-20-2476.
164. Gimble R.C. , Bhargava S. , Dixit D. , Rich J.N. Glioblastoma Stem Cells: Lessons from the Tumor Hierarchy in a Lethal Cancer. // *Genes Dev*. – 2019. – V. 33. – P. 591–609. – doi:10.1101/gad.324301.119.
165. Negrini S. , Gorgoulis V.G. , Halazonetis T.D. Genomic Instability — an Evolving Hallmark of Cancer. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2010. – V. 11. – P. 220–228. – doi:10.1038/nrm2858.

166. King H.O. , Brend T. , Payne H.L. , Wright A. , Ward T.A. , Patel K. , Egnuni T. , Stead L.F. , Patel A. , Wurdak H. , et al. RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells. // *Stem Cell Reports*. – 2017. – V. 8. – P. 125–139. – doi:10.1016/j.stemcr.2016.12.005.
167. De Bacco F. , D'Ambrosio A. , Casanova E. , Orzan F. , Neggia R. , Albano R. , Verginelli F. , Cominelli M. , Poliani P.L. , Luraghi P. , et al. MET Inhibition Overcomes Radiation Resistance of Glioblastoma Stem-like Cells. // *EMBO Mol Med*. – 2016. – V. 8. – P. 550–568. –doi:10.15252/emmm.201505890.
168. Xue Y. MiR-210 Up-Regulation Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Glioma Cells by Targeting SIN3A. // *Med Sci Monit*. – 2014. – V. 20. – P. 2571–2577. – doi:10.12659/MSM.892994.
169. Kim J.H. , Park S.G. , Song S.-Y. , Kim J.K. , Sung J.-H. Reactive Oxygen Species-Responsive MiR-210 Regulates Proliferation and Migration of Adipose-Derived Stem Cells via PTPN2. // *Cell Death Dis*. – 2013. – V. 4. – P. e588–e588. – doi:10.1038/cddis.2013.117.
170. Yang W. , Wei J. , Guo T. , Shen Y. , Liu F. Knockdown of MiR-210 Decreases Hypoxic Glioma Stem Cells Stemness and Radioresistance. // *Experimental Cell Research*. – 2014. – V. 326. – P. 22–35. –doi:10.1016/j.yexcr.2014.05.022.
171. Guo P. , Lan J. , Ge J. , Nie Q. , Guo L. , Qiu Y. , Mao Q. MiR-26a Enhances the Radiosensitivity of Glioblastoma Multiforme Cells through Targeting of Ataxia–Telangiectasia Mutated. // *Experimental Cell Research*. – 2014. – V. 320. – P. 200–208. – doi:10.1016/j.yexcr.2013.10.020.
172. Ye L. , Yu G. , Wang C. , Du B. , Sun D. , Liu J. , Qi T. , Yu X. , Wei W. , Cheng J. , et al. MicroRNA-128a BMI1 Polycomb Ring Finger Oncogene and Reactive Oxygen Species Inhibit the Growth of U-87 MG Glioblastoma Cells Following Exposure to X-Ray Radiation. // *Molecular Medicine Reports*. – 2015. – V. 12. – P. 6247–6254. – doi:10.3892/mmr.2015.4175.
173. Daneman R. , Prat A. The Blood-Brain Barrier. // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2015. – V. 7. – P. a020412. – doi:10.1101/cshperspect.a020412.
174. Lipinski C.A. , Lombardo F. , Dominy B.W. , Feeney P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1997. – V. 23. – P. 3–25. – doi:10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
175. Tyagi R. , Rosa B.A. , Mitreva M. Omics-Driven Knowledge-Based Discovery of Anthelmintic Targets and Drugs. // *In Silico Drug Design* , Elsevier. – 2019. – P. 329–358. – ISBN 978-0-12-816125-8.

176. Yang X. , Saito R. , Nakamura T. , Zhang R. , Sonoda Y. , Kumabe T. , Forsayeth J. , Bankiewicz K. , Tominaga T. Peri-Tumoral Leakage during Intra-Tumoral Convection-Enhanced Delivery Has Implications for Efficacy of Peri-Tumoral Infusion before Removal of Tumor. // *Drug Delivery*. – 2016. – V. 23. – P. 771–776. – doi:10.3109/10717544.2014.914987.
177. Seyedmiraie H. , Shobeiri P. , Turgut M. , Hanaei S. , Rezaei N. VEGF Levels in Patients with Glioma: A Systematic Review and Meta-Analysis. // *Reviews in the Neurosciences*. – 2021. – V. 32. – P. 191–202. – doi:10.1515/revneuro-2020-0062.
178. Seano G. Targeting the Perivascular Niche in Brain Tumors.// *Current Opinion in Oncology*. –2018. – V. 30. – P. 54–60. – doi:10.1097/CCO.0000000000000417.
179. Mercurio A. VEGF/Neuropilin Signaling in Cancer Stem Cells. // *IJMS*. – 2019. – V. 20. – P. 490. –doi:10.3390/ijms20030490.
180. Reardon D.A. , Wen P.Y. Therapeutic Advances in the Treatment of Glioblastoma: Rationale and Potential Role of Targeted Agents. // *The Oncologist*. – 2006. – V. 11. – P. 152–164. – doi:10.1634/theoncologist.11-2-152.
181. Ahir B.K. , Engelhard H.H. , Lakka S.S. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. // *Mol Neurobiol*. – 2020. – V. 57. – P. 2461–2478. – doi:10.1007/s12035-020-01892-8.
182. Hu P. , Li S. , Tian N. , Wu F. , Hu Y. , Li D. , Qi Y. , Wei Z. , Wei Q. , Li Y. , et al. Acidosis Enhances the Self-Renewal and Mitochondrial Respiration of Stem Cell-like Glioma Cells through CYP24A1-Mediated Reduction of Vitamin D. // *Cell Death Dis*. – 2019. – V. 10. – P. 25. – doi:10.1038/s41419-018-1242-1.
183. Duraj T. , García-Romero N. , Carrión-Navarro J. , Madurga R. , Ortiz De Mendivil A. , Prat-Acin R. , Garcia-Cañamaque L. , Ayuso-Sacido A. Beyond the Warburg Effect: Oxidative and Glycolytic Phenotypes Coexist within the Metabolic Heterogeneity of Glioblastoma. // *Cells*. – 2021. – V. 10. – P. 202. –doi:10.3390/cells10020202.
184. Shinsato Y. , Furukawa T. , Yunoue S. , Yonezawa H. , Minami K. , Nishizawa Y. , Ikeda R. , Kawahara K. , Yamamoto M. , Hirano H. , et al. Reduction of MLH1 and PMS2 Confers Temozolomide Resistance and Is Associated with Recurrence of Glioblastoma. // *Oncotarget*. – 2013. – V. 4. – P. 2261–2270. – doi:10.18632/oncotarget.1302.
185. Cahill D.P. , Levine K.K. , Betensky R.A. , Codd P.J. , Romany C.A. , Reavie L.B. , Batchelor T.T. , Futreal P.A. , Stratton M.R. , Curry W.T. , et al. Loss of the Mismatch Repair Protein MSH6 in Human Glioblastomas Is Associated with Tumor Progression during Temozolomide Treatment.// *Clinical Cancer Research*. – 2007. – V. 13. – P. 2038–2045. – doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2149.

186. Stark A.M. , Doukas A. , Hugo H.-H. , Hedderich J. , Hattermann K. , Maximilian Mehdorn H. , Held-Feindt J. Expression of DNA Mismatch Repair Proteins MLH1 MSH2 and MSH6 in Recurrent Glioblastoma. // *Neurological Research*. – 2015. – V. 37. – P. 95–105. – doi:10.1179/1743132814Y.00000000409.
187. Wang J. , Wakeman T.P. , Lathia J.D. , Hjelmeland A.B. , Wang X.-F. , White R.R. , Rich J.N. , Sullenger B.A. Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. // *Stem Cells*. – 2010. – V. 28. – P. 17–28. – doi:10.1002/stem.261.
188. Sharifzad F. , Ghavami S. , Verdi J. , Mardpour S. , Mollapour Sisakht M. , Azizi Z. , Taghikhani A. , Łos M.J. , Fakharian E. , Ebrahimi M. , et al. Glioblastoma Cancer Stem Cell Biology: Potential Theranostic Targets. // *Drug Resistance Updates*. –2019. – V. 42. – P. 35–45. –doi:10.1016/j.drug.2018.03.003.
189. Wang H. , Lai Q. , Wang D. , Pei J. , Tian B. , Gao Y. , Gao Z. , Xu X. Hedgehog Signaling Regulates the Development and Treatment of Glioblastoma (Review). // *Oncol Lett*. – 2022. – V. 24. – P. 294. – doi:10.3892/ol.2022.13414.
190. Valdés-Rives S.A. , Casique-Aguirre D. , Germán-Castelán L. , Velasco-Velázquez M.A. , González-Arenas A. Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications. // *BioMed Research International*. – 2017. – V. 20171. – P.12. – doi:10.1155/2017/7403747.
191. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. // *Toxicol Pathol*. – 2007. – V. 35. – P. 495–516 – doi:10.1080/01926230701320337.
192. Tummers B. , Green D.R. Caspase-8: Regulating Life and Death. // *Immunol Rev*. – 2017. – V. 277. – P. 76–89. – doi:10.1111/imr.12541.
193. Cantley L.C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. // *Science*. – 2002. – V. 296. – P. 1655–1657. – doi:10.1126/science.296.5573.1655.
194. Mao H. , LeBrun D.G. , Yang J. , Zhu V.F. , Li M. Deregulated Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. // *Cancer Investigation*. – 2012. – V. 30. – P. 48–56. – doi:10.3109/07357907.2011.630050.
195. Daniele S. , Costa B. , Zappelli E. , Da Pozzo E. , Sestito S. , Nesi G. , Campiglia P. , Marinelli L. , Novellino E. , Rapposelli S. , et al. Combined Inhibition of AKT/MTOR and MDM2 Enhances Glioblastoma Multiforme Cell Apoptosis and Differentiation of Cancer Stem Cells. // *Sci Rep*. – 2015. – V. 5. – P. 9956 – doi:10.1038/srep09956.
196. Zhang T. , Ma C. , Zhang Z. , Zhang H. , Hu H. NF-κB Signaling in Inflammation and Cancer. // *MedComm*. – 2021. – V. 2. – P. 618–653. – doi:10.1002/mco2.104.
197. Abbas R. , Larisch S. Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death—The Story of ARTS and SMAC. // *Cells*. – 2020. – V. 9. – P. 663. – doi:10.3390/cells9030663.

198. Lopez P.L.C. , Filippi-Chiela E.C. , Silva A.O. , Cordero E.A.A. , Garcia-Santos D. , Pelegrini A.L. , Reder G.M. , Barbieri N.L. , Lenz G. Sensitization of Glioma Cells by X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Knockdown. // *Oncology*. – 2012. – V. 83. – P. 75–82. – doi:10.1159/000337978.
199. Zhao X.-Y. , Wang X.-Y. , Wei Q.-Y. , Xu Y.-M. , Lau A.T.Y. Potency and Selectivity of SMAC/DIABLO Mimetics in Solid Tumor Therapy. // *Cells*. – 2020. – V. 9 .– P. 1012. – doi:10.3390/cells9041012.
200. Yang Y. , Shao N. , Luo G. , Li L. , Zheng L. , Nilsson-Ehle P. , Xu N. Mutations of PTEN Gene in Gliomas Correlate to Tumor Differentiation and Short-Term Survival Rate. // *Anticancer Res*. – 2010. – V. 30. – 981–985.
201. Ashizawa T. , Miyata H. , Iizuka A. , Komiyama M. , Oshita C. , Kume A. , Nogami M. , Yagoto M. , Ito I. , Oishi T. , et al. Effect of the STAT3 Inhibitor STX-0119 on the Proliferation of Cancer Stem-like Cells Derived from Recurrent Glioblastoma.// *International Journal of Oncology*. – 2013. – V. 43. – P. 219–227. – doi:10.3892/ijo.2013.1916.
202. Shi L. MicroRNA-125b-2 Confers Human Glioblastoma Stem Cells Resistance to Temozolomide through the Mitochondrial Pathway of Apoptosis. // *Int J Oncol*. – 2011. – doi:10.3892/ijo.2011.1179.
203. Rathod S.S. , Rani S.B. , Khan M. , Muzumdar D. , Shiras A. Tumor Suppressive MiRNA-34a Suppresses Cell Proliferation and Tumor Growth of Glioma Stem Cells by Targeting Akt and Wnt Signaling Pathways. // *FEBS Open Bio*. – 2014. –V. 4. – P. 485–495 – doi:10.1016/j.fob.2014.05.002.
204. Mapunda J.A. , Tibar H. , Regragui W. , Engelhardt B. How Does the Immune System Enter the Brain? // *Front. Immunol*. – 2022. – V. 13. – P.805657. – doi:10.3389/fimmu.2022.805657.
205. Brahmer J. , Reckamp K.L. , Baas P. , Crinò L. , Eberhardt W.E.E. , Poddubskaya E. , Antonia S. , Pluzanski A. , Vokes E.E. , Holgado E. , et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. // *N Engl J Med*. – 2015. – V. 373. – P. 123–135. – doi:10.1056/NEJMoa1504627.
206. Robert C. , Long G.V. , Brady B. , Dutriaux C. , Maio M. , Mortier L. , Hassel J.C. , Rutkowski P. , McNeil C. , Kalinka-Warzocha E. , et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. // *N Engl J Med*. – 2015. – V. 372. – P. 320–330. – doi:10.1056/NEJMoa1412082.
207. Desjardins A. , Gromeier M. , Herndon J.E. , Beaubier N. , Bolognesi D.P. , Friedman A.H. , Friedman H.S. , McSherry F. , Muscat A.M. , Nair S. , et al. Recurrent

Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. // *N Engl J Med.* – 2018. – V. 379. – P. 150–161. – doi:10.1056/NEJMoa1716435.

208. Reardon D.A. , Omuro A. , Brandes A.A. , Rieger J. , Wick A. , Sepulveda J. , Phuphanich S. , De Souza P. , Ahluwalia M.S. , Lim M. , et al. OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. // *Neuro-Oncology.* – 2017. – V. 19. – P. iii21–iii21. – doi:10.1093/neuonc/nox036.071.

209. Mehling M. , Simon P. , Mittelbronn M. , Meyermann R. , Ferrone S. , Weller M. , Wiendl H. WHO Grade Associated Downregulation of MHC Class I Antigen-Processing Machinery Components in Human Astrocytomas: Does It Reflect a Potential Immune Escape Mechanism? // *Acta Neuropathol.* – 2007. – V. 114. – P. 111–119. – doi:10.1007/s00401-007-0231-8.

210. Zagzag D. , Salnikow K. , Chiriboga L. , Yee H. , Lan L. , Ali M.A. , Garcia R. , Demaria S. , Newcomb E.W. Downregulation of Major Histocompatibility Complex Antigens in Invading Glioma Cells: Stealth Invasion of the Brain. // *Laboratory Investigation.* – 2005. – V. 85. – P. 328–341. – doi:10.1038/labinvest.3700233.

211. Qian J. , Luo F. , Yang J. , Liu J. , Liu R. , Wang L. , Wang C. , Deng Y. , Lu Z. , Wang Y. , et al. TLR2 Promotes Glioma Immune Evasion by Downregulating MHC Class II Molecules in Microglia. // *Cancer Immunology Research.* – 2018. – V. 6. – P. 1220–1233. – doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0020.

212. Schartner J.M. , Hagar A.R. , Van Handel M. , Zhang L. , Nadkarni N. , Badie B. Impaired Capacity for Upregulation of MHC Class II in Tumor-Associated Microglia. // *Glia* – 2005. – V. 51. – P. 279–285 – doi:10.1002/glia.20201.

213. Crane C.A. , Ahn B.J. , Han S.J. , Parsa A.T. Soluble Factors Secreted by Glioblastoma Cell Lines Facilitate Recruitment Survival and Expansion of Regulatory T Cells: Implications for Immunotherapy. // *Neuro-Oncology.* – 2012. – V. 14. – P. 584–595. – doi:10.1093/neuonc/nos014.

214. Zhai L. , Lauing K.L. , Chang A.L. , Dey M. , Qian J. , Cheng Y. , Lesniak M.S. , Wainwright D.A. The Role of IDO in Brain Tumor Immunotherapy. // *J Neurooncol.* – 2015. – V. 123. – P. 395–403. – doi:10.1007/s11060-014-1687-8.

215. Bronte V. , Zanovello P. Regulation of Immune Responses by L-Arginine Metabolism. // *Nat Rev Immunol.* – 2005. – V. 5. – P. 641–654. – doi:10.1038/nri1668.

216. Gabrilovich D.I. , Nagaraj S. Myeloid-Derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System. // *Nat Rev Immunol.* – 2009. – V. 9. – P. 162–174. – doi:10.1038/nri2506.

217. Marvel D. , Gabrilovich D.I. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment: Expect the Unexpected.// *Journal of Clinical Investigation*. – 2015. – V. 125 – P. 3356–3364. – doi:10.1172/JCI80005.
218. Wu A. , Wei J. , Kong L.-Y. , Wang Y. , Priebe W. , Qiao W. , Sawaya R. , Heimberger A.B. Glioma Cancer Stem Cells Induce Immunosuppressive Macrophages/Microglia.// *Neuro-Oncology*. – 2010. – V. 12. – P. 1113–1125. – doi:10.1093/neuonc/noq082.
219. Zhou W. , Bao S. Cancer Stem Cells and Tumor-Associated Macrophages.// *In Cancer Stem Cells*, Elsevier. – 2016. – P. 367–394. – ISBN 978-0-12-803892-5.
220. Zhao J. , Chen A.X. , Gartrell R.D. , Silverman A.M. , Aparicio L. , Chu T. , Bordbar D. , Shan D. , Samanamud J. , Mahajan A. , et al. Immune and Genomic Correlates of Response to Anti-PD-1 Immunotherapy in Glioblastoma. // *Nat Med*. – 2019. – V. 25. – P. 462–469. – doi:10.1038/s41591-019-0349-y.
221. Sampson J.H. , Heimberger A.B. , Archer G.E. , Aldape K.D. , Friedman A.H. , Friedman H.S. , Gilbert M.R. , Herndon J.E. , McLendon R.E. , Mitchell D.A. , et al. Immunologic Escape After Prolonged Progression-Free Survival With Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Peptide Vaccination in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. // *JCO*. – 2010. – V. 28. – P. 4722–4729. – doi:10.1200/JCO.2010.28.6963.
222. Buijs P.R. , Verhagen J.H. , Van Eijck C.H. , Van Den Hoogen B.G. Oncolytic Viruses: From Bench to Bedside with a Focus on Safety. // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2015. – V. 11. – P. 1573–1584. – doi:10.1080/21645515.2015.1037058.
223. Sivanandam V. , LaRocca C.J. , Chen N.G. , Fong Y. , Warner S.G. Oncolytic Viruses and Immune Checkpoint Inhibition: The Best of Both Worlds. // *Molecular Therapy - Oncolytics*. – 2019. – V. 13. – P. 93–106. – doi:10.1016/j.omto.2019.04.003.
224. Carey B.L. , Ahmed M. , Puckett S. , Lyles D.S. Early Steps of the Virus Replication Cycle Are Inhibited in Prostate Cancer Cells Resistant to Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus. // *J Virol*. – 2008. – V. 82. – P. 12104–12115. – doi:10.1128/JVI.01508-08.
225. Dhiman N. , Jacobson R.M. , Poland G.A. Measles Virus Receptors: SLAM and CD46. // *Rev. Med. Virol*. – 2004. – V. 14. – P. 217–229. – doi:10.1002/rmv.430.
226. Mercer J. , Helenius A. Virus Entry by Macropinocytosis. // *Nat Cell Biol*. – 2009. – V. 11. – P. 510–520. – doi:10.1038/ncb0509-510.
227. Mercer J. , Helenius A. Vaccinia Virus Uses Macropinocytosis and Apoptotic Mimicry to Enter Host Cells. // *Science*. – 2008. – V. 320. – P. 531–535. – doi:10.1126/science.1155164.



228. Tian B. , Lessan K. , Kahm J. , Kleidon J. , Henke C. B1 Integrin Regulates Fibroblast Viability during Collagen Matrix Contraction through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Protein Kinase B Signaling Pathway. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – P. 24667–24675. – doi:10.1074/jbc.M203565200.
229. Saeed M.F. , Kolokoltsov A.A. , Freiberg A.N. , Holbrook M.R. , Davey R.A. Phosphoinositide-3 Kinase-Akt Pathway Controls Cellular Entry of Ebola Virus. // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4. – P. e1000141 – doi:10.1371/journal.ppat.1000141.
230. Oh M.-J. , Akhtar J. , Desai P. , Shukla D. A Role for Heparan Sulfate in Viral Surfing. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – V. 391 – P. 176–181. – doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.027.
231. Cui J. , Zhao S. , Li Y. , Zhang D. , Wang B. , Xie J. , Wang J. Regulated Cell Death: Discovery Features and Implications for Neurodegenerative Diseases. // *Cell Commun Signal*. – 2021. – V. 19. –P. 120. – doi:10.1186/s12964-021-00799-8.
232. He S. , Wang L. , Miao L. , Wang T. , Du F. , Zhao L. , Wang X. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- $\alpha$ . // *Cell*. – 2009. – V. 137. – P. 1100–1111. –doi:10.1016/j.cell.2009.05.021.
233. Pasparakis M. , Vandenabeele P. Necroptosis and Its Role in Inflammation. // *Nature*. – 2015. – V. 517. – P. 311–320. – doi:10.1038/nature14191.
234. Feoktistova M. , Geserick P. , Kellert B. , Dimitrova D.P. , Langlais C. , Hupe M. , Cain K. , MacFarlane M. , Häcker G. , Leverkus M. CIAPs Block Ripoptosome Formation a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by CFLIP Isoforms. // *Molecular Cell*. –2011. – V. 43. – P. 449–463. – doi:10.1016/j.molcel.2011.06.011.
235. Dong Y. , Sun Y. , Huang Y. , Dwarakanath B. , Kong L. , Lu J.J. Upregulated Necroptosis-Pathway-Associated Genes Are Unfavorable Prognostic Markers in Low-Grade Glioma and Glioblastoma Multiforme. // *Transl. Cancer Res*. – 2019. –V. 8. – P. 821–827. – doi:10.21037/tcr.2019.05.01.
236. Yan W.-L. , Shen K.-Y. , Tien C.-Y. , Chen Y.-A. , Liu S.-J. Recent Progress in GM-CSF-Based Cancer Immunotherapy. // *Immunotherapy*. – 2017. – V. 9. – P. 347–360. – doi:10.2217/imt-2016-0141.
237. Kumar A. , Taghi Khani A. , Sanchez Ortiz A. , Swaminathan S. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. // *Front. Immunol*. – 2022. – V. 13. – P. 901277. – doi:10.3389/fimmu.2022.901277.
238. Su S. , Liu Q. , Chen J. , Chen J. , Chen F. , He C. , Huang D. , Wu W. , Lin L. , Huang W. , et al. A Positive Feedback Loop between Mesenchymal-like Cancer Cells and

Macrophages Is Essential to Breast Cancer Metastasis. // *Cancer Cell*. – 2014. – V. 25. – P. 605–620. – doi:10.1016/j.ccr.2014.03.021.

239. Wang T. , Zhao Y. , Peng L. , Chen N. , Chen W. , Lv Y. , Mao F. , Zhang J. , Cheng P. , Teng Y. , et al. Tumour-Activated Neutrophils in Gastric Cancer Foster Immune Suppression and Disease Progression through GM-CSF-PD-L1 Pathway. // *Gut*. – 2017. – V. 66. – P. 1900–1911. –doi:10.1136/gutjnl-2016-313075.

240. Yasuda M. , Theodorakis P. , Subramanian T. , Chinnadurai G. Adenovirus E1B-19K/BCL-2 Interacting Protein BNIP3 Contains a BH3 Domain and a Mitochondrial Targeting Sequence. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – P. 12415–12421. – doi:10.1074/jbc.273.20.12415.

241. Imazu T. , Shimizu S. , Tagami S. , Matsushima M. , Nakamura Y. , Miki T. , Okuyama A. , Tsujimoto Y. Bcl-2/E1B 19 KDa-Interacting Protein 3-like Protein (Bnip3L) Interacts with Bcl-2/Bcl-XL and Induces Apoptosis by Altering Mitochondrial Membrane Permeability.// *Oncogene*. – 1999. – V. 18. –P. 4523–4529. – doi:10.1038/sj.onc.1202722.

242. Pantelidou C. , Cherubini G. , Lemoine N.R. , Halldén G. The E1B19K-Deleted Oncolytic Adenovirus Mutant AdΔ19K Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Drug-Induced DNA-Damage by down-Regulating Caspin and Mre11. // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7.– P. 15703–15724 – doi:10.18632/oncotarget.7310.

243. Quan L.T. , Caputo A. , Bleackley R.C. , Pickup D.J. , Salvesen G.S. Granzyme B Is Inhibited by the Cowpox Virus Serpin Cytokine Response Modifier A. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – V. 270. – P. 10377–10379. – doi:10.1074/jbc.270.18.10377.

244. Santos C.R. , Vega F.M. , Blanco S. , Barcia R. , Lazo P.A. The Vaccinia Virus B1R Kinase Induces P53 Downregulation by an Mdm2-Dependent Mechanism. // *Virology*. – 2004. – V. 328. – P. 254–265. – doi:10.1016/j.virol.2004.08.013.

245. Yoo N.-K. , Pyo C.-W. , Kim Y. , Ahn B.-Y. , Choi S.-Y. Vaccinia Virus-Mediated Cell Cycle Alteration Involves Inactivation of Tumour Suppressors Associated with Brf1 and TBP. *Cell Microbiol* –2008 – 10 – 583–592 – doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01047.x.

246. Postigo A. , Ramsden A.E. , Howell M. , Way M. Cytoplasmic ATR Activation Promotes Vaccinia Virus Genome Replication. // *Cell Reports*. – 2017. – V. 19. – P. 1022–1032. – doi:10.1016/j.celrep.2017.04.025.

247. He B. Viruses Endoplasmic Reticulum Stress and Interferon Responses. // *Cell Death Differ*. –2006. – V. 13. – P. 393–403. – doi:10.1038/sj.cdd.4401833.

248. Gerlic M. , Faustin B. , Postigo A. , Yu E.C.-W. , Proell M. , Gombosuren N. , Krajewska M. , Flynn R. , Croft M. , Way M. , et al. Vaccinia Virus F1L Protein Promotes

Virulence by Inhibiting Inflammasome Activation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2013. – V. 110. – P. 7808–7813. –doi:10.1073/pnas.1215995110.

249. Lopez-Castejon G. , Brough D. Understanding the Mechanism of IL-1 $\beta$  Secretion. // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* – 2011. – V. 22. – P. 189–195. – doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.

250. Teicher B.A. *Anticancer Drug Development Guide* // Andrews P.A. Eds. , Humana Press: Totowa NJ. – 2004. – ISBN 978-1-4684-9841-7.

251. Almendro V. , Marusyk A. , Polyak K. Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2013. – V. 8. – P. 277–302. – doi:10.1146/annurev-pathol-020712-163923.

252. Baskaran S. , Mayrhofer M. , Kultima H.G. , Bergström T. , Elfineh L. , Cavelier L. , Isaksson A. , Nelander S. Primary Glioblastoma Cells for Precision Medicine: A Quantitative Portrait of Genomic (in)Stability during the First 30 Passages. // *Neuro-Oncology.* – 2018. – V. 20. – P. 1080–1091. –doi:10.1093/neuonc/noy024.

253. Singh S.K. , Clarke I.D. , Terasaki M. , Bonn V.E. , Hawkins C. , Squire J. , Dirks P.B. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63. – P. 5821–5828.

254. Da Hora C.C. , Schweiger M.W. , Wurdinger T. , Tannous B.A. Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals. // *Cells.* – 2019. – V. 8. – P. 1177. – doi:10.3390/cells8101177.

255. Ignatova T.N. , Kukekov V.G. , Laywell E.D. , Suslov O.N. , Vrionis F.D. , Steindler D.A. Human Cortical Glial Tumors Contain Neural Stem-like Cells Expressing Astroglial and Neuronal Markers in Vitro. // *Glia* – 2002. – V. 39. – P. 193–206. – doi:10.1002/glia.10094.

256. Nehama D. , Di Ianni N. , Musio S. , Du H. , Patané M. , Pollo B. , Finocchiaro G. , Park J.J.H. , Dunn D.E. , Edwards D.S. , et al. B7-H3-Redirected Chimeric Antigen Receptor T Cells Target Glioblastoma and Neurospheres. // *EBioMedicine.* – 2019. – V. 47. – P. 33–43. – doi:10.1016/j.ebiom.2019.08.030.

257. Annovazzi L. , Caldera V. , Mellai M. , Riganti C. , Battaglia L. , Chirio D. , Melcarne A. , Schiffer D. The DNA Damage/Repair Cascade in Glioblastoma Cell Lines after Chemotherapeutic Agent Treatment. // *International Journal of Oncology.* – 2015. – V. 46. – P. 2299–2308. –doi:10.3892/ijo.2015.2963.

258. Chu Q. , Orr B.A. , Semenkow S. , Bar E.E. , Eberhart C.G. Prolonged Inhibition of Glioblastoma Xenograft Initiation and Clonogenic Growth Following In Vivo Notch Blockade.

// *Clinical Cancer Research*. – 2013. – V. 19. – P. 3224–3233. – doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2119.

259. Fukuhara H. , Ino Y. , Todo T. Oncolytic Virus Therapy: A New Era of Cancer Treatment at Dawn. // *Cancer Sci*. – 2016. – V. 107. – P. 1373–1379. – doi:10.1111/cas.13027.

260. Louis D.N. , Perry A. , Reifenberger G. , Von Deimling A. , Figarella-Branger D. , Cavenee W.K. , Ohgaki H. , Wiestler O.D. , Kleihues P. , Ellison D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. // *Acta Neuropathol*. – 2016. – V. 131. – P. 803–820. – doi:10.1007/s00401-016-1545-1.

261. Sasmita A.O. , Wong Y.P. , Ling A.P.K. Biomarkers and Therapeutic Advances in Glioblastoma Multiforme. // *Asia-Pac J Clin Oncol*. – 2018. – V. 14. – P. 40–51. – doi:10.1111/ajco.12756.

262. Auffinger B. , Spencer D. , Pytel P. , Ahmed A.U. , Lesniak M.S. The Role of Glioma Stem Cells in Chemotherapy Resistance and Glioblastoma Multiforme Recurrence. // *Expert Review of Neurotherapeutics*. – 2015. – V.15. – P.741–752. – doi:10.1586/14737175.2015.1051968.

263. Hattermann K. , Flüh C. , Engel D. , Mehdorn H.M. , Synowitz M. , Mentlein R. , Held-Feindt J. Stem Cell Markers in Glioma Progression and Recurrence.// *International Journal of Oncology*. – 2016. – V. 49. – P. 1899–1910. – doi:10.3892/ijo.2016.3682.

264. Lauko A. , Lo A. , Ahluwalia M.S. , Lathia J.D. Cancer Cell Heterogeneity & Plasticity in Glioblastoma and Brain Tumors. // *Seminars in Cancer Biology*. – 2022. –V. 82. – P. 162–175. –doi:10.1016/j.semcancer.2021.02.014.

265. Cimadamore F. , Fishwick K. , Giusto E. , Gnedeva K. , Cattarossi G. , Miller A. , Pluchino S. , Brill L.M. , Bronner-Fraser M. , Terskikh A.V. Human ESC-Derived Neural Crest Model Reveals a Key Role for SOX2 in Sensory Neurogenesis. // *Cell Stem Cell*. – 2011. – V. 8. – P. 538–551. – doi:10.1016/j.stem.2011.03.011.

266. Amador-Arjona A. , Cimadamore F. , Huang C.-T. , Wright R. , Lewis S. , Gage F.H. , Terskikh A.V. SOX2 Primes the Epigenetic Landscape in Neural Precursors Enabling Proper Gene Activation during Hippocampal Neurogenesis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2015. – V. 112. – doi:10.1073/pnas.1421480112.

267. Lopez-Bertoni H. , Kotchetkov I.S. , Mihelson N. , Lal B. , Rui Y. , Ames H. , Lugo-Fagundo M. , Guerrero-Cazares H. , Quiñones-Hinojosa A. , Green J.J. , et al. A Sox2:MiR-486-5p Axis Regulates Survival of GBM Cells by Inhibiting Tumor Suppressor Networks. // *Cancer Research*. – 2020. – V. 80. –P. 1644–1655. – doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-1624.

268. Lopez-Bertoni H. , Johnson A. , Rui Y. , Lal B. , Sall S. , Malloy M. , Coulter J.B. , Lugo-Fagundo M. , Shudir S. , Khela H. , et al. Sox2 Induces Glioblastoma Cell Stemness and Tumor Propagation by Repressing TET2 and Dereulating 5hmC and 5mC DNA Modifications. // *Sig Transduct Target Ther.* –2022. – V. 7. – P. 37. – doi:10.1038/s41392-021-00857-0.
269. Li J. , Ek F. , Olsson R. , Belting M. , Bengzon J. Glioblastoma CD105+ Cells Define a SOX2– Cancer Stem Cell-like Subpopulation in the Pre-Invasive Niche. // *acta neuropathol commun.* – 2022. – V. 10. – P. 126. –doi:10.1186/s40478-022-01422-8.
270. Murphy M.J. , Wilson A. , Trumpp A. More than Just Proliferation: Myc Function in Stem Cells. // *Trends in Cell Biology.* – 2005. – V. 15. – P. 128–137. – doi:10.1016/j.tcb.2005.01.008.
271. Kochneva G.V. , Grazhdantseva A.A. , Sivolobova G.F. , Tkacheva A.V. , Shvalov A.N. , Unusova A.Yu. , Ryabchikova E.I. , Netesov S.V. A Model of the Artificial Metastasis of Human Epidermoid Carcinoma A431 in Nude Mice for Examination of the Oncolytic Activity of Vaccinia Virus. // *Vestn. VOGiS.* – 2015. – V. 19. – P. 480. – doi:10.18699/VJ15.064.
272. Elena A. , Melina C. , Raffaele N. , Carlo B. , Vittoria N. , Francesco A. , Gaetano F. , Marica E. Extraneural Metastases in Glioblastoma Patients: Two Cases with YKL-40-Positive Glioblastomas and a Meta-Analysis of the Literature. // *Neurosurg Rev.* – 2016. – V. 39. – P. 37–46. – doi:10.1007/s10143-015-0656-9.
272. Sun Q. , Xu R. , Xu H. , Wang G. , Shen X. , Jiang H. Extracranial Metastases of High-Grade Glioma: The Clinical Characteristics and Mechanism. // *World J Surg Onc.* – 2017. – V. 15. – P. 181. – doi:10.1186/s12957-017-1249-6.
274. Rosen J. , Blau T. , Grau S.J. , Barbe M.T. , Fink G.R. , Galldiks N. Extracranial Metastases of a Cerebral Glioblastoma: A Case Report and Review of the Literature. // *Case Rep Oncol.* – 2018. – V. 11. – P. 591–600. – doi:10.1159/000492111.
275. Seo Y.J. , Cho W.H. , Kang D.W. , Cha S.H. Extraneural Metastasis of Glioblastoma Multiforme Presenting as an Unusual Neck Mass. // *J Korean Neurosurg Soc.* – 2012. – V. 51. – P. 147. –doi:10.3340/jkns.2012.51.3.147.
276. Lah T.T. , Novak M. , Breznik B. Brain Malignancies: Glioblastoma and Brain Metastases. // *Seminars in Cancer Biology.* – 2020. – V. 60. – P. 262–273. – doi:10.1016/j.semcancer.2019.10.010.
277. Piccirilli M. , Brunetto G.M.F. , Rocchi G. , Giangaspero F. , Salvati M. Extra Central Nervous System Metastases from Cerebral Glioblastoma Multiforme in Elderly Patients.

- Clinico-Pathological Remarks on Our Series of Seven Cases and Critical Review of the Literature. // *Tumori*. – 2008. – V. 94. – P. 40–51. – doi:10.1177/030089160809400109.
278. Huszthy P.C. , Daphu I. , Niclou S.P. , Stieber D. , Nigro J.M. , Sakariassen P.O. , Miletic H. , Thorsen F. , Bjerkvig R. In Vivo Models of Primary Brain Tumors: Pitfalls and Perspectives. // *Neuro-Oncology*. – 2012. – V. 14. – P. 979–993. – doi:10.1093/neuonc/nos135.
279. Ernst A. , Hofmann S. , Ahmadi R. , Becker N. , Korshunov A. , Engel F. , Hartmann C. , Felsberg J. , Sabel M. , Peterziel H. , et al. Genomic and Expression Profiling of Glioblastoma Stem Cell-Like Spheroid Cultures Identifies Novel Tumor-Relevant Genes Associated with Survival. // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – V. 15. – P. 6541–6550. – doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0695.
280. Clark M.J. , Homer N. , O'Connor B.D. , Chen Z. , Eskin A. , Lee H. , Merriman B. , Nelson S.F. U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. // *PLoS Genet*. – 2010. – V. 6. – P. e1000832. – doi:10.1371/journal.pgen.1000832.
281. Kerstetter-Fogle A.E. , Harris P.L.R. , Brady-Kalnay S.M. , Sloan A.E. Generation of Glioblastoma Patient-Derived Intracranial Xenografts for Preclinical Studies. // *IJMS*. – 2020. – V. 21. – P. 5113. – doi:10.3390/ijms21145113.
282. Franco-Luzón L. , González-Murillo Á. , Alcántara-Sánchez C. , García-García L. , Tabasi M. , Huertas A.L. , Chesler L. , Ramírez M. Systemic Oncolytic Adenovirus Delivered in Mesenchymal Carrier Cells Modulate Tumor Infiltrating Immune Cells and Tumor Microenvironment in Mice with Neuroblastoma. // *Oncotarget*. – 2020. – V. 11. – P.347–361. – doi:10.18632/oncotarget.27401.
283. Oberoi R.K. , Parrish K.E. , Sio T.T. , Mittapalli R.K. , Elmquist W.F. , Sarkaria J.N. Strategies to Improve Delivery of Anticancer Drugs across the Blood–Brain Barrier to Treat Glioblastoma. // *Neuro Oncol*. – 2016. – V. 18. – P. 27–36. – doi:10.1093/neuonc/nov164.
284. Ganipineni L.P. , Danhier F. , Prétat V. Drug Delivery Challenges and Future of Chemotherapeutic Nanomedicine for Glioblastoma Treatment. // *Journal of Controlled Release*. – 2018. V. 281. – P. 42–57. – doi:10.1016/j.jconrel.2018.05.008.
285. Zhan C. , Lu W. The Blood-Brain/Tumor Barriers: Challenges and Chances for Malignant Gliomas Targeted Drug Delivery. // *CPB*. – 2012. – V. 13. – P. 2380–2387. – doi:10.2174/138920112803341798.
286. Schlageter K.E. , Molnar P. , Lapin G.D. , Groothuis D.R. Microvessel Organization and Structure in Experimental Brain Tumors: Microvessel Populations with Distinctive Structural and Functional Properties. // *Microvascular Research*. – 1999. – V. 58. – P. 312–328. – doi:10.1006/mvre.1999.2188.

287. Sarin H. , Kanevsky A.S. , Wu H. , Brimacombe K.R. , Fung S.H. , Sousa A.A. , Auh S. , Wilson C.M. , Sharma K. , Aronova M.A. , et al. Effective Transvascular Delivery of Nanoparticles across the Blood-Brain Tumor Barrier into Malignant Glioma Cells. // *J Transl Med.* – 2008. – V. 6. – P. 80. – doi:10.1186/1479-5876-6-80.
288. Li L. , Liu S. , Han D. , Tang B. , Ma J. Delivery and Biosafety of Oncolytic Virotherapy. // *Front. Oncol.* – 2020. – V. 10. – P. 475. – doi:10.3389/fonc.2020.00475.
289. Sostoa J.D. , Dutoit V. , Migliorini D. Oncolytic Viruses as a Platform for the Treatment of Malignant Brain Tumors.// *IJMS.* – 2020. – V. 21. – P. 7449. – doi:10.3390/ijms21207449.
290. Parker Kerrigan B.C. , Shimizu Y. , Andreeff M. , Lang F.F. Mesenchymal Stromal Cells for the Delivery of Oncolytic Viruses in Gliomas. // *Cytotherapy.* – 2017. – V. 19. – P. 445–457. – doi:10.1016/j.jcyt.2017.02.002.
291. Niemann J. , Woller N. , Brooks J. , Fleischmann-Mundt B. , Martin N.T. , Kloos A. , Knocke S. , Ernst A.M. , Manns M.P. , Kubicka S. , et al. Molecular Retargeting of Antibodies Converts Immune Defense against Oncolytic Viruses into Cancer Immunotherapy. // *Nat Commun.* – 2019. – V. 10. – P. 3236. – doi:10.1038/s41467-019-11137-5.
292. Lauer U.M. , Schell M. , Beil J. , Berchtold S. , Koppenhöfer U. , Glatzle J. , Königsrainer A. , Möhle R. , Nann D. , Fend F. , et al. Phase I Study of Oncolytic Vaccinia Virus GL-ONC1 in Patients with Peritoneal Carcinomatosis. // *Clinical Cancer Research.* – 2018. – V. 24. – P. 4388–4398. – doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0244.
293. Park S.H. , Breitbach C.J. , Lee J. , Park J.O. , Lim H.Y. , Kang W.K. , Moon A. , Mun J.-H. , Sommermann E.M. , Maruri Avidal L. , et al. Phase 1b Trial of Biweekly Intravenous Pexa-Vec (JX-594) an Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Virus in Colorectal Cancer. // *Molecular Therapy.* – 2015. – V. 23. – P. 1532–1540. – doi:10.1038/mt.2015.109.
294. Downs-Canner S. , Guo Z.S. , Ravindranathan R. , Breitbach C.J. , O'Malley M.E. , Jones H.L. , Moon A. , McCart J.A. , Shuai Y. , Zeh H.J. , et al. Phase 1 Study of Intravenous Oncolytic Poxvirus (VvDD) in Patients With Advanced Solid Cancers. // *Molecular Therapy.* – 2016. – V. 24. –P. 1492–1501. – doi:10.1038/mt.2016.101.
295. Heo J. , Reid T. , Ruo L. , Breitbach C.J. , Rose S. , Bloomston M. , Cho M. , Lim H.Y. , Chung H.C. , Kim C.W. , et al. Randomized Dose-Finding Clinical Trial of Oncolytic Immunotherapeutic Vaccinia JX-594 in Liver Cancer. // *Nat Med.* – 2013. – V. 19. – P. 329–336. – doi:10.1038/nm.3089.

296. Jayawardena N. , Poirier J.T. , Burga L.N. , Bostina M. Virus–Receptor Interactions and Virus Neutralization: Insights for Oncolytic Virus Development. // *OV*. – 2020. – V. 9. – P. 1–15. –doi:10.2147/OV.S186337.
297. Hwang T.-H. , Moon A. , Burke J. , Ribas A. , Stephenson J. , Breitbach C.J. , Daneshmand M. , De Silva N. , Parato K. , Diallo J.-S. , et al. A Mechanistic Proof-of-Concept Clinical Trial With JX-594 a Targeted Multi-Mechanistic Oncolytic Poxvirus in Patients With Metastatic Melanoma. // *Molecular Therapy*. – 2011. – V. 19. – P. 1913–1922. – doi:10.1038/mt.2011.132.
298. Benda P. , Lightbody J. , Sato G. , Levine L. , Sweet W. Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. // *Science*. – 1968. – V. 161. – P. 370–371. – doi:10.1126/science.161.3839.370.
299. Giakoumettis D. , Kritis A. , Foroglou N. C6 Cell Line: The Gold Standard in Glioma Research. // *Hippokratia*. – 2018. – V. 22 – P. 105–112.
300. Delfino R., Barros F., et.al. A Pilot Study of Survival in Glioblastomas: Proliferative Index Ki-67, Risk Factors and Implications. // *In Techniques in Neurosurgery & Neurology*. – TNN. 000615. – 2023. – Vol. 5.
301. Barthel P., Staabs F., Li L.Y., Buthut M., et.al. Immunoreactivity to Astrocytes in Different Forms of Dementia: High Prevalence of Autoantibodies to GFAP. // *Brain, Behavior, & Immunity - Health*. – 2023. – V. 29. – P. 100609. – doi:10.1016/j.bbih.2023.100609.
302. Žurek, J. Biomarkers in Traumatic Brain Injury. // *In Essentials of Neuroanesthesia*; Elsevier. – 2017. – P. 587–591. – ISBN 978-0-12-805299-0.
303. Bammer R. Basic Principles of Diffusion-Weighted Imaging. // *European Journal of Radiology*. – 2003. – V. 45. – P. 169–184. – doi:10.1016/S0720-048X(02)00303-0.
304. Cartes-Zumelzu, F.W.; Stavrou, I.; Castillo, M.; Eisenhuber, E.; Knosp, E.; Thurnher, M.M. Diffusion-Weighted Imaging in the Assessment of Brain Abscesses Therapy. // *AJNR Am J Neuroradiol*. – 2004. – V. 25. – P. 1310–1317.
305. Khalid N. , Azimpouran M. Necrosis. // *In StatPearls* , StatPearls Publishing: Treasure Island (FL) – 2023.
306. Gurvich E.B. , Vilesova I.S. Vaccinia Virus in Postvaccinal Encephalitis. // *Acta Virol*. – 1983. – V. 27. – 154–159.
307. Omuro A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. // *JAMA*. – 2013. – V. 310. – P. 1842. – doi:10.1001/jama.2013.280319.
308. Armento A. , Ehlers J. , Schötterl S. , Naumann U. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Motility.// *In Glioblastoma* , Department of Neurosurgery University Hospitals



Leuven Leuven Belgium De Vleeschouwer S. Eds. , Codon Publications. – 2017. – P. 73–93 – ISBN 978-0-9944381-2-6.

309. Stupp R. , Mason W.P. , van den Bent M.J. , Weller M. , Fisher B. , Taphoorn M.J.B. , Belanger K. , Brandes A.A. , Marosi C. , Bogdahn U. , et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. // *N Engl J Med.* – 2005. – V. 352. – P. 987–996. – doi:10.1056/NEJMoa043330.

310. Singh N. , Miner A. , Hennis L. , Mittal S. Mechanisms of Temozolomide Resistance in Glioblastoma - a Comprehensive Review. // *CDR* – 2020. – doi:10.20517/cdr.2020.79.

311. Saghir N.S.E. , Hawkins K.A. Hepatotoxicity Following Vincristine Therapy. // *Cancer.* – 1984. – V. 54. – P. 2006–2008. – doi:10.1002/1097-0142(19841101)54:9<2006::AID-CNCR2820540937>3.0.CO;2-F.

312. Park S.B. , Goldstein D. , Krishnan A.V. , Lin C.S.-Y. , Friedlander M.L. , Cassidy J. , Koltzenburg M. , Kiernan M.C. Chemotherapy-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Critical Analysis: CIPN: A Critical Analysis. // *CA A Cancer Journal for Clinicians.* – 2013. – V. 63. – P. 419–437. – doi:10.3322/caac.21204.

313. King P.D. , Perry M.C. Hepatotoxicity of Chemotherapy. // *The Oncologist.* – 2001. – V. 6. – P. 162–176. – doi:10.1634/theoncologist.6-2-162.

314. Kaina B. Temozolomide in Glioblastoma Therapy: Role of Apoptosis Senescence and Autophagy. Comment on Strobel et al. Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. // *Biomedicines.* – 2019. – V. 7. – P. 90. – doi:10.3390/biomedicines7040090.

315. Blackford A.N. , Jackson S.P. ATM ATR and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. // *Molecular Cell.* – 2017. – V. 66. – P. 801–817. – doi:10.1016/j.molcel.2017.05.015.

316. Yoshioka K. , Yoshioka Y. , Hsieh P. ATR Kinase Activation Mediated by MutS $\alpha$  and MutL $\alpha$  in Response to Cytotoxic O6-Methylguanine Adducts. // *Molecular Cell.* – 2006. – V. 22. – P. 501–510. – doi:10.1016/j.molcel.2006.04.023.

317. Thorne S.H. , Hwang T.-H.H. , O’Gorman W.E. , Bartlett D.L. , Sei S. , Kanji F. , Brown C. , Werier J. , Cho J.-H. , Lee D.-E. , et al. Rational Strain Selection and Engineering Creates a Broad-Spectrum Systemically Effective Oncolytic Poxvirus JX-963. // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V. 117. – P. 3350–3358. – doi:10.1172/JCI32727.

318. Zandnejadi, A.; Eftekhar-Javadi, A.; Moradi Tabriz, H. Postoperative Extra-Cranial Metastasis of Glioblastoma: A Case Report. // *Iran J Pathol.* – 2021. – V. 16. – P. 90–94. – doi:10.30699/ijp.2020.122780.2349.

319. Bhat K.P.L. , Balasubramaniyan V. , Vaillant B. , Ezhilarasan R. , Hummelink K. , Hollingsworth F. , Wani K. , Heathcock L. , James J.D. , Goodman L.D. , et al. Mesenchymal Differentiation Mediated by NF-KB Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. // *Cancer Cell*. – 2013. – V. 24. – P. 331–346. – doi:10.1016/j.ccr.2013.08.001.
320. Soares J.A.P. , Leite F.G.G. , Andrade L.G. , Torres A.A. , De Sousa L.P. , Barcelos L.S. , Teixeira M.M. , Ferreira P.C.P. , Kroon E.G. , Souto-Padrón T. , et al. Activation of the PI3K/Akt Pathway Early during Vaccinia and Cowpox Virus Infections Is Required for Both Host Survival and Viral Replication.// *J Virol*. – 2009. – V. 83. – P. 6883–6899. – doi:10.1128/JVI.00245-09.
321. Lei M. , Lu W. , Meng W. , Parrini M.-C. , Eck M.J. , Mayer B.J. , Harrison S.C. Structure of PAK1 in an Autoinhibited Conformation Reveals a Multistage Activation Switch. // *Cell*. – 2000. – V. 102. – P. 387–397. – doi:10.1016/S0092-8674(00)00043-X.
322. Meshki J. , Douglas S.D. , Hu M. , Leeman S.E. , Tuluc F. Substance P Induces Rapid and Transient Membrane Blebbing in U373MG Cells in a P21-Activated Kinase-Dependent Manner. // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – P. e25332. – doi:10.1371/journal.pone.0025332.
323. Moore S.F. , Hunter R.W. , Hers I. MTORC2 Protein-Mediated Protein Kinase B (Akt) Serine 473 Phosphorylation Is Not Required for Akt1 Activity in Human Platelets. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286. – P. 24553–24560. – doi:10.1074/jbc.M110.202341.
324. Meade N. , Furey C. , Li H. , Verma R. , Chai Q. , Rollins M.G. , DiGiuseppe S. , Naghavi M.H. , Walsh D. Poxviruses Evade Cytosolic Sensing through Disruption of an MTORC1-MTORC2 Regulatory Circuit. // *Cell*. – 2018. – V. 174. – P. 1143-1157.e17. – doi:10.1016/j.cell.2018.06.053.
325. Szymonowicz K. , Oeck S. , Malewicz N. , Jendrossek V. New Insights into Protein Kinase B/Akt Signaling: Role of Localized Akt Activation and Compartment-Specific Target Proteins for the Cellular Radiation Response. // *Cancers*. – 2018. – V. 10. – P. 78. – doi:10.3390/cancers10030078.
326. Alessi D.R. , James S.R. , Downes C.P. , Holmes A.B. , Gaffney P.R.J. , Reese C.B. , Cohen P. Characterization of a 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase Which Phosphorylates and Activates Protein Kinase Ba. // *Current Biology*. – 1997. – V. 7. – P. 261–269. – doi:10.1016/S0960-9822(06)00122-9.
327. Manning B.D. , Cantley L.C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream.// *Cell*. – 2007. – V. 129. – P. 1261–1274. – doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
328. Memmott R.M. , Dennis P.A. Akt-Dependent and -Independent Mechanisms of MTOR Regulation in Cancer. // *Cellular Signalling*. – 2009. – V. 21. – P. 656–664. – doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.004.

329. Zhou H. , Li X.-M. , Meinkoth J. , Pittman R.N. Akt Regulates Cell Survival and Apoptosis at a Postmitochondrial Level. // *The Journal of Cell Biology*. – 2000. – V. 151. – P. 483–494. – doi:10.1083/jcb.151.3.483.
330. Cetintas V.B. , Batada N.N. Is There a Causal Link between PTEN Deficient Tumors and Immunosuppressive Tumor Microenvironment? // *J Transl Med*. – 2020. – V. 18. – P. 45. – doi:10.1186/s12967-020-02219-w.
331. Smith J.S. , Tachibana I. , Passe S.M. , Huntley B.K. , Borell T.J. , Iturria N. , O'Fallon J.R. , Schaefer P.L. , Scheithauer B.W. , James C.D. , et al. PTEN Mutation EGFR Amplification and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. – 2001. – V. 93. – P. 1246–1256. – doi:10.1093/jnci/93.16.1246.
332. Geue S. , Aurbach K. , Manke M.-C. , Manukjan G. , Münzer P. , Stegner D. , Brähler C. , Walker-Allgaier B. , Märklin M. , Borst C.E. , et al. Pivotal Role of PDK1 in Megakaryocyte Cytoskeletal Dynamics and Polarization during Platelet Biogenesis. // *Blood*. – 2019. – V. 134. – P. 1847–1858. – doi:10.1182/blood.2019000185.
333. Han J.E. , Lim P.W. , Na C.M. , Choi Y.S. , Lee J.Y. , Kim Y. , Park H.W. , Moon H.E. , Heo M.S. , Park H.R. , et al. Inhibition of HIF1 $\alpha$  and PDK Induces Cell Death of Glioblastoma Multiforme. // *Exp Neurobiol*. – 2017. – V. 26. – P. 295–306. – doi:10.5607/en.2017.26.5.295.
334. Velpula K.K. , Tsung A.J. PDK1: A New Therapeutic Target for Glioblastoma? // *CNS Oncology* – 2014. – V. 3. – P. 177–179. – doi:10.2217/cns.14.13.
335. Leventis P.A. , Grinstein S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. // *Annu. Rev. Biophys.* – 2010. – V. 39. – P. 407–427. – doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131234.
336. Renò F. , Burattini S. , Rossi S. , Luchetti F. , Columbaro M. , Santi S. , Papa S. , Falcieri E. Phospholipid Rearrangement of Apoptotic Membrane Does Not Depend on Nuclear Activity. // *Histochemistry and Cell Biology*. – 1998. – V. 110. – P. 467–476. – doi:10.1007/s004180050308.
337. Saraste A. Morphologic and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. // *Cardiovascular Research*. – 2000. – V. 45. – P. 528–537. – doi:10.1016/S0008-6363(99)00384-3.
338. Whilding L.M. , Archibald K.M. , Kulbe H. , Balkwill F.R. , Öberg D. , McNeish I.A. Vaccinia Virus Induces Programmed Necrosis in Ovarian Cancer Cells. // *Molecular Therapy*. – 2013. – V. 21. – P. 2074–2086. – doi:10.1038/mt.2013.195.

339. Koehler H.S. , Jacobs B.L. Subversion of Programed Cell Death by Poxviruses. // In , Current Topics in Microbiology and Immunology , Springer Berlin Heidelberg: Berlin Heidelberg. – 2020.
340. Greiner S. , Humrich J.Y. , Thuman P. , Sauter B. , Schuler G. , Jenne L. The Highly Attenuated Vaccinia Virus Strain Modified Virus Ankara Induces Apoptosis in Melanoma Cells and Allows Bystander Dendritic Cells to Generate a Potent Anti-Tumoral Immunity. // Clinical and Experimental Immunology. – 2006. – V. 146. – P. 344–353. – doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03177.x.
341. Humlová Z. , Vokurka M. , Esteban M. , Mělková Z. Vaccinia Virus Induces Apoptosis of Infected Macrophages. // Journal of General Virology. – 2002. – V. 83. – P. 2821–2832. – doi:10.1099/0022-1317-83-11-2821.
342. Estornes Y. , Toscano F. , Virard F. , Jacquemin G. , Pierrot A. , Vanbervliet B. , Bonnin M. , Lalaoui N. , Mercier-Gouy P. , Pachéco Y. , et al. DsRNA Induces Apoptosis through an Atypical Death Complex Associating TLR3 to Caspase-8. // Cell Death Differ. – 2012. – V. 19. – P. 1482–1494. – doi:10.1038/cdd.2012.22.
343. Mielcarska M.B., Bossowska-Nowicka M., Toka F.N. Cell Surface Expression of Endosomal Toll-Like Receptors—A Necessity or a Superfluous Duplication? // Front. Immunol. – 2021. – V. 11. – P. 620972. – doi:10.3389/fimmu.2020.620972.
344. Pohar J., Pirher N., Benčina M., Manček-Keber M., Jerala R. The Ectodomain of TLR3 Receptor Is Required for Its Plasma Membrane Translocation. // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – P. e92391. – doi:10.1371/journal.pone.0092391.
345. Nailwal H. , Chan F.K.-M. Necroptosis in Anti-Viral Inflammation. // Cell Death Differ. – 2019. – V. 26. – P. 4–13. – doi:10.1038/s41418-018-0172-x.
346. O'Donnell M.A. , Perez-Jimenez E. , Oberst A. , Ng A. , Massoumi R. , Xavier R. , Green D.R. , Ting A.T. Caspase 8 Inhibits Programmed Necrosis by Processing CYLD. // Nat Cell Biol. – 2011. – V. 13. – P. 1437–1442. – doi:10.1038/ncb2362.
347. Pop C. , Oberst A. , Drag M. , Van Raam B.J. , Riedl S.J. , Green D.R. , Salvesen G.S. FLIPL Induces Caspase 8 Activity in the Absence of Interdomain Caspase 8 Cleavage and Alters Substrate Specificity. // Biochemical Journal. – 2011. – V. 433. – P. 447–457. – doi:10.1042/BJ20101738.
348. Kominami K. , Nakabayashi J. , Nagai T. , Tsujimura Y. , Chiba K. , Kimura H. , Miyawaki A. , Sawasaki T. , Yokota H. , Manabe N. , et al. The Molecular Mechanism of Apoptosis upon Caspase-8 Activation: Quantitative Experimental Validation of a Mathematical Model. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. – 2012. – V. 1823. – P. 1825–1840. – doi:10.1016/j.bbamcr.2012.07.003.

349. Kruidering M. , Evan G. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of “The End”? // *TBMB*. – 2000. – V. 50. – P. 85–90. – doi:10.1080/713803693.
350. Fomin A.S. , Koval O.A. , Semenov D.V. , Potapenko M.O. , Kuligina E.V. , Kit Yu.Ya. , Richter V.A. Analysis of Biochemical Markers of MCF-7 Cell Apoptosis Induced by a Recombinant Analogue of Lactaptin. // *Russ J Bioorg Chem*. – 2012. – V. 38. – P. 77–82. – doi:10.1134/S1068162012010086.
351. Koval O.A. , Tkachenko A.V. , Fomin A.S. , Semenov D.V. , Nushtaeva A.A. , Kuligina E.V. , Zavjalov E.L. , Richter V.A. Lactaptin Induces P53-Independent Cell Death Associated with Features of Apoptosis and Autophagy and Delays Growth of Breast Cancer Cells in Mouse Xenografts. // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9. – P. e93921. – doi:10.1371/journal.pone.0093921.
352. Du C. , Fang M. , Li Y. , Li L. , Wang X. Smac a Mitochondrial Protein That Promotes Cytochrome c–Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. // *Cell*. – 2000. – V. 102. – P. 33–42. – doi:10.1016/S0092-8674(00)00008-8.
353. Kvansakul M. , Yang H. , Fairlie W.D. , Czabotar P.E. , Fischer S.F. , Perugini M.A. , Huang D.C.S. , Colman P.M. Vaccinia Virus Anti-Apoptotic F1L Is a Novel Bcl-2-like Domain-Swapped Dimer That Binds a Highly Selective Subset of BH3-Containing Death Ligands. // *Cell Death Differ*. – 2008. – V. 15. – P. 1564–1571. – doi:10.1038/cdd.2008.83.
354. Aoyagi M. , Zhai D. , Jin C. , Aleshin A.E. , Stec B. , Reed J.C. , Liddington R.C. Vaccinia Virus N1L Protein Resembles a B Cell Lymphoma-2 (Bcl-2) Family Protein. // *Protein Science*. – 2006. – V. 16. – P. 118–124. – doi:10.1110/ps.062454707.
355. Dewson G. , Kluck R.M. Mechanisms by Which Bak and Bax Permeabilise Mitochondria during Apoptosis. // *Journal of Cell Science*. – 2009. – V. 122. – P. 2801–2808. – doi:10.1242/jcs.038166.
356. Toshiyuki M. , Reed J.C. Tumor Suppressor P53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human Bax Gene.// *Cell*. – 1995. – V. 80. – P. 293–299. – doi:10.1016/0092-8674(95)90412-3.
357. Oda E. , Ohki R. , Murasawa H. , Nemoto J. , Shibue T. , Yamashita T. , Tokino T. , Taniguchi T. , Tanaka † Nobuyuki Noxa a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of P53-Induced Apoptosis. // *Science*. – 2000. – V. 288. – P. 1053–1058. – doi:10.1126/science.288.5468.1053.
358. Oda K. , Arakawa H. , Tanaka T. , Matsuda K. , Tanikawa C. , Mori T. , Nishimori H. , Tamai K. , Tokino T. , Nakamura Y. , et al. P53AIP1 a Potential Mediator of P53-Dependent Apoptosis and Its Regulation by Ser-46-Phosphorylated P53. // *Cell*. – 2000. – V. 102. – P. 849–862. – doi:10.1016/S0092-8674(00)00073-8.

359. Nakano K. , Vousden K.H. PUMA a Novel Proapoptotic Gene Is Induced by P53. // *Molecular Cell*. – 2001. – V. 7. – P. 683–694. – doi:10.1016/S1097-2765(01)00214-3.
360. Emery I.F. , Gopalan A. , Wood S. , Chow K. , Battelli C. , George J. , Blaszyk H. , Florman J. , Yun K. Expression and Function of ABCG2 and XIAP in Glioblastomas. // *J Neurooncol*. – 2017. – V. 133. – P. 47–57. – doi:10.1007/s11060-017-2422-z.
361. Prabhu K.S. , Siveen K.S. , Kuttikrishnan S. , Iskandarani A. , Tsakou M. , Achkar I.W. , Therachiyil L. , Krishnankutty R. , Parray A. , Kulinski M. , et al. Targeting of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein and PI3-Kinase/AKT Signaling by Embelin Suppresses Growth of Leukemic Cells. // *PLoS ONE*. – 2017. – V. 12. – P. e0180895. – doi:10.1371/journal.pone.0180895.
362. Carter B.Z. , Milella M. , Tsao T. , McQueen T. , Schober W.D. , Hu W. , Dean N.M. , Steelman L. , McCubrey J.A. , Andreeff M. Regulation and Targeting of Antiapoptotic XIAP in Acute Myeloid Leukemia. // *Leukemia*. – 2003. – V. 17. – P. 2081–2089. – doi:10.1038/sj.leu.2403113.
363. Hussain A.R. , Bu R. , Ahmed M. , Jehan Z. , Beg S. , Al-Sobhi S. , Al-Dayel F. , Siraj A.K. , Uddin S. , Al-Kuraya K.S. Role of X-Linked Inhibitor of Apoptosis as a Prognostic Marker and Therapeutic Target in Papillary Thyroid Carcinoma. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2015. – V. 100. – P. E974–E985. – doi:10.1210/jc.2014-4356.
364. Zhang Y. , Huang F. , Luo Q. , Wu X. , Liu Z. , Chen H. , Huang Y. Inhibition of XIAP Increases Carboplatin Sensitivity in Ovarian Cancer. // *OTT*. – 2018. – V. 11. – P. 8751–8759. – doi:10.2147/OTT.S171053.
365. Carter B.Z. , Gronda M. , Wang Z. , Welsh K. , Pinilla C. , Andreeff M. , Schober W.D. , Nefzi A. , Pond G.R. , Mawji I.A. , et al. Small-Molecule XIAP Inhibitors Derepress Downstream Effector Caspases and Induce Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells. // *Blood*. – 2005. – V. 105. – P. 4043–4050. – doi:10.1182/blood-2004-08-3168.
366. Bahar M.W. , Graham S.C. , Chen R.A.-J. , Cooray S. , Smith G.L. , Stuart D.I. , Grimes J.M. How Vaccinia Virus Has Evolved to Subvert the Host Immune Response. // *Journal of Structural Biology*. – 2011. – V. 175. – P. 127–134. – doi:10.1016/j.jsb.2011.03.010.
367. Cooray S. , Bahar M.W. , Abrescia N.G.A. , McVey C.E. , Bartlett N.W. , Chen R.A.-J. , Stuart D.I. , Grimes J.M. , Smith G.L. Functional and Structural Studies of the Vaccinia Virus Virulence Factor N1 Reveal a Bcl-2-like Anti-Apoptotic Protein. // *Journal of General Virology*. – 2007. – V. 88. – P. 1656–1666. – doi:10.1099/vir.0.82772-0.
368. Graham S.C. , Bahar M.W. , Cooray S. , Chen R.A.-J. , Whalen D.M. , Abrescia N.G.A. , Alderton D. , Owens R.J. , Stuart D.I. , Smith G.L. , et al. Vaccinia Virus Proteins A52

and Bcl-2–Like Fold but Have Evolved to Inhibit NF- $\kappa$ B Rather than Apoptosis. // PLoS Pathog. – 2008. – V. 4. – P. e1000128. – doi:10.1371/journal.ppat.1000128.

369. Santos C.R., Blanco S., Sevilla A., Lazo P.A. Vaccinia Virus B1R Kinase Interacts with JIP1 and Modulates C-Jun-Dependent Signaling. // J Virol. – 2006. – V. 80. – P. 7667–7675. – doi:10.1128/JVI.00967-06.

370. Yun C.-O., Hong J., Yoon A.-R. Current Clinical Landscape of Oncolytic Viruses as Novel Cancer Immunotherapeutic and Recent Preclinical Advancements. // Front. Immunol. – 2022. – V. 13. – P. 953410. – doi:10.3389/fimmu.2022.953410.

371. Alberts P., Tilgase A., Rasa A., Bandere K., Venskus D. The Advent of Oncolytic Virotherapy in Oncology: The Rigvir® Story. // European Journal of Pharmacology. – 2018. – V. 837. – P. 117–126. – doi:10.1016/j.ejphar.2018.08.042.

372. Liang M. Oncorine the World First Oncolytic Virus Medicine and Its Update in China. // CCDT. – 2018. – V. 18. – P. 171–176. – doi:10.2174/1568009618666171129221503.

373. Ferrucci P.F., Pala L., Conforti F., Cocorocchio E. Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. // Cancers. – 2021. – V. 13. – P. 1383. – doi:10.3390/cancers13061383.

## Приложение А

Таблица А1. Характеристика вирусного препарата VV-GMCSF-Lact.

<b>Описание</b>	<p>Лекарственное средство на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-LACT вируса осповакцины, субстанция (раствор замороженный) охарактеризован как замороженный раствор. Представляет собой затвердевшую белого цвета массу. После размораживания – бесцветная жидкость прозрачная или слабо опалесцирующая.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>								
<b>Подлинность</b>	<p>Для доказательства подлинности был разработана и валидирована методика ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров на модифицированные районы генома вируса осповакцины – район частичной делеции гена тимидинкиназы (tk-ген) со встройкой трансгена ГМ-КСФ и район частичной делеции гена вирусного ростового фактора (vgf-ген) со встройкой трансгена лактапина: СМА.005-2017 «Определение подлинности лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины».</p> <p>Структуры праймеров приведены в таблице 24.1.</p> <p>Таблица 24.1 - Структуры праймеров для ПЦР-анализа модифицированных областей генома штамма VV-GMCSF-Lact</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Район генома</th><th>Олигонуклеотидные праймеры</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">vgf-ген</td><td>Ара-L22 - 5'- CGAGCACAATACCGGGAGATGG 3'</td></tr> <tr> <td>Up35 5'GTAAGCAAAGAATATAAGAATGAAGCG TAATGAT 3'</td></tr> <tr> <td rowspan="2">tk-ген</td><td>TK-flank 2 as 5'- TCTCGGTTTCCTCACCCAAT 3'</td></tr> <tr> <td>TK-flank 1 sense 5'- CAGAATTAATTAGACGAGTTAGACG 3'</td></tr> </tbody> </table> <p>Нормой является: Длины фрагментов ДНК штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, полученные в результате ПЦР с использованием специфичных пар праймеров, должны соответствовать расчетным (таблица 24.2), образования других ампликонов не должно происходить</p> <p>Таблица 24.2 - Теоретически рассчитанные длины ПЦР-продуктов, получаемых при использовании в качестве матричной ДНК штамма</p>	Район генома	Олигонуклеотидные праймеры	vgf-ген	Ара-L22 - 5'- CGAGCACAATACCGGGAGATGG 3'	Up35 5'GTAAGCAAAGAATATAAGAATGAAGCG TAATGAT 3'	tk-ген	TK-flank 2 as 5'- TCTCGGTTTCCTCACCCAAT 3'	TK-flank 1 sense 5'- CAGAATTAATTAGACGAGTTAGACG 3'
Район генома	Олигонуклеотидные праймеры								
vgf-ген	Ара-L22 - 5'- CGAGCACAATACCGGGAGATGG 3'								
	Up35 5'GTAAGCAAAGAATATAAGAATGAAGCG TAATGAT 3'								
tk-ген	TK-flank 2 as 5'- TCTCGGTTTCCTCACCCAAT 3'								
	TK-flank 1 sense 5'- CAGAATTAATTAGACGAGTTAGACG 3'								



	VV-GMCSF-Lact и геномную ДНК немодифицированного штамма Л-ИВП вируса осповакцины.		
	Ген	Длина ПЦР-продукта в зависимости от типа матричной ДНК, п.н.*	
		Геном штамма Л-ИВП	Геном штамма VV-GMCSF-Lact
	<i>vgf</i> -ген	584	710
	<i>tk</i> -ген	414	1760
* п.н. – пара нуклеотидов.			
Все исследованные серии отвечают этому требованию.			
<b>Прозрачность</b>	<p>Для определения прозрачности был выбран визуальный метод, соответствующий требованиям ОФС.1.2.1.0007.15 Прозрачность и степень мутности. На основании ОФС разработана методика «Определение прозрачности и степени мутности лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины (СМА.003-2017).</p> <p>Нормой является: Размороженный раствор должен быть прозрачным или опалесценция не должна превышать опалесценцию эталона I.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>		
<b>Цветность</b>	<p>Для определения был выбран визуальный метод, ОФС.1.2.1.0006.15 Степень окраски жидкости.</p> <p>На основании ОФС разработана методика «Определение степени окраски лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса (СМА.002-2017)</p> <p>Нормой является: Размороженный раствор должен быть бесцветным.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>		
<b>рН</b>	<p>Для определения рН был выбран потенциометрический метод, соответствующий требованиям ОФС.1.2.1.0004.15 Ионметрия.</p> <p>На основании ОФС разработана методика «Определение рН лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса» (СМА 001-2017).</p> <p>Нормой является: рН от 6,2 до 6,8</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>		
<b>Стерильность</b>	<p>Для определения стерильности был выбран метод прямого посева, соответствующий требованиям ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность.</p>		

	<p>На основании ОФС разработана методика «Определение стерильности лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса сповакцины» (СММ.001-2017).</p> <p>Нормой является: Размороженный раствор должен быть стерильным.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Микоплазмы</b>	<p>Для выявления микоплазм был выбран метод посева с применением среды Каган соответствующий требованиям ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм.</p> <p>На основании ОФС разработана методика «Испытание на присутствие микоплазм в лекарственном средстве на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины» (СММ.003-2017).</p> <p>Нормой является: Препарат не должен содержать микоплазм.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Бактериальные эндотоксины</b>	<p>Для определения был выбран метод, соответствующий требованиям ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины (количественный метод, метод В).</p> <p>На основании ОФС разработана методика «Определение бактериальных эндотоксинов в лекарственном средстве на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины» (СМА.007-2017).</p> <p>Нормой является: Не более 0,5 ЕЭ/мл</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Аномальная токсичность</b>	<p>Для определения аномальной токсичности был выбран биологический метод, соответствующий требованиям ОФС.1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность.</p> <p>На основании ОФС разработана методика «Определение аномальной токсичности лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, СМБ.007-2017».</p> <p>Нормой является: Размороженный раствор должен быть не токсичным.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Титр вируса</b>	<p>Для определения количественного содержания вируса в ФС была разработана и валидирована методика «Определение титра вируса в лекарственном средстве на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины» (СМБ.002-2017).</p> <p>Титр вируса измеряют в количестве БОЕ, образованных вирусом на монослой клеток 4647, в единице объема вирусной суспензии (мл) – БОЕ/мл.</p>

	<p>Нормой является: Титр рекомбинантного вируса осповакцины при титровании на культуре клеток 4647 должен быть от <math>1 \cdot 10^7</math> БОЕ/мл до <math>2 \cdot 10^7</math> БОЕ/мл.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Специфическая активность</b>	<p>Для оценки специфической активности лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины была разработана и валидирована биологическая методика определения дозы заражения, вызывающей 50%-ный литический эффект раковых клеток человека: «Определение специфической активности лекарственного средства на основе на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины» (СМБ.001-2017).</p> <p>Нормой является: Доза заражения, вызывающая 50%-ный литический эффект клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 - не более, чем 0,1 БОЕ/клетка</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Бычий сывороточный альбумин</b>	<p>Для определения содержание бычьего сывороточного альбумина (БСА) в лекарственном средстве нами был предложен определяют метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием иммобилизованных поликлональных антител к БСА и пероксидазой хрена, меченной анти-БСА антител в качестве системы обнаружения.</p> <p>Разработана и частично валидирована методика «Определение содержания бычьего сывороточного альбумина (БСА) методом иммуноферментного анализа в лекарственном средстве на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины» (СМА.006-2017).</p> <p>Нормой является: содержание БСА не более 50 нг/мл</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Содержание клеточной ДНК</b>	<p>Поскольку клеточным субстратом для получения лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины является линия клеток почки африканской зеленой мартышки 4647, нами разработана и валидирована методика определения остаточной клеточной ДНК в субстанции методом ПЦР.</p> <p>Разработана и валидирована аналитическая методика «Определение содержания ДНК клеток 4647 в лекарственном средстве на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины» (СМА.009-2017).</p> <p>Нормой является: Содержание ДНК клеток 4647 должно быть не более 10 нг/мл.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>

<b>Посторонние вирусные агенты</b>	<p>Для идентификации посторонних вирусных агентов в составе лекарственного средства на основе вируса осповакцины нами предложена методика, основанная на оценке появления нехарактерных для вируса осповакцины изменений на хорионаллантоисных оболочках (ХАО) 11-12 суточных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ).</p> <p>Разработана и валидирована методика «Испытание лекарственного средства на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины на присутствие посторонних агентов» (СМБ.006-2017).</p> <p>Нормой является: Посторонние вирусные агенты должны отсутствовать</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Белок</b>	<p>Для определения белка был выбран колориметрический метод, соответствующий требованиям ОФС.1.7.2.0023.15 Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах.</p> <p>На основании ОФС разработана аналитическая методика «Определение белка в лекарственном средстве на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины» (СМА.004-2017)</p> <p>Нормой является: Не более 100 мкг/мл</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Механические включения</b>	<p>Для определения механических включений был выбран визуальный метод, соответствующий требованиям ОФС.1.4.2.0005.15 Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах.</p> <p>На основании ОФС разработана методика «Определение механических включений в лекарственном средстве на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины» (СМА.008-2017).</p> <p>Нормой является: Размороженный раствор должен выдерживать требования.</p> <p>Все исследованные серии отвечают этим требованиям.</p>
<b>Производственный штамм</b>	<p>Штамм VV-GMCSF-Lact получен на основе штамма Л-ИБП вируса осповакцины, содержащего делеции фрагментов генов вирусной тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены: ген ГМ-КСФ человека и ген лактапина, соответственно. Депонирован в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», кол. № V-688.</p>

<b>Упаковка и хранение</b>	<p>Упаковка и условия хранения обеспечивают качество лекарственного средства в течение установленного срока годности.</p> <p>Хранение лекарственного средства основе VV-GMCSF-Lact проводят в соответствии с ОФС.1.1.0010.15 Хранение лекарственных средств, при температуре не выше минус 40 °С</p> <p>По 100 мл в бутылках стеклянных для крови, трансфузионных и инфузионных препаратов, герметично укупоренных резиновыми пробками и обжатых алюминиевыми колпачками</p>
<b>Маркировка</b>	<p>Сведения, содержащиеся на этикетке упаковки, регламентированы требованиями ОФС.1.8.1.0002.15 Иммунобиологические лекарственные препараты и Федеральным законом №61 Об обращении лекарственных средств.</p> <p>Текст, наносимый на упаковку, не противоречит и не искажает информацию, указанную в НД</p>
<b>Транспортирование</b>	<p>Транспортирование лекарственного средства должно осуществляться в соответствии с ОФС.1.1.0010.15 Хранение лекарственных средств, при температуре не выше минус 40 °С</p>
<b>Срок годности</b>	3 года .Срок наблюдения 36 месяцев.

## Приложение Б

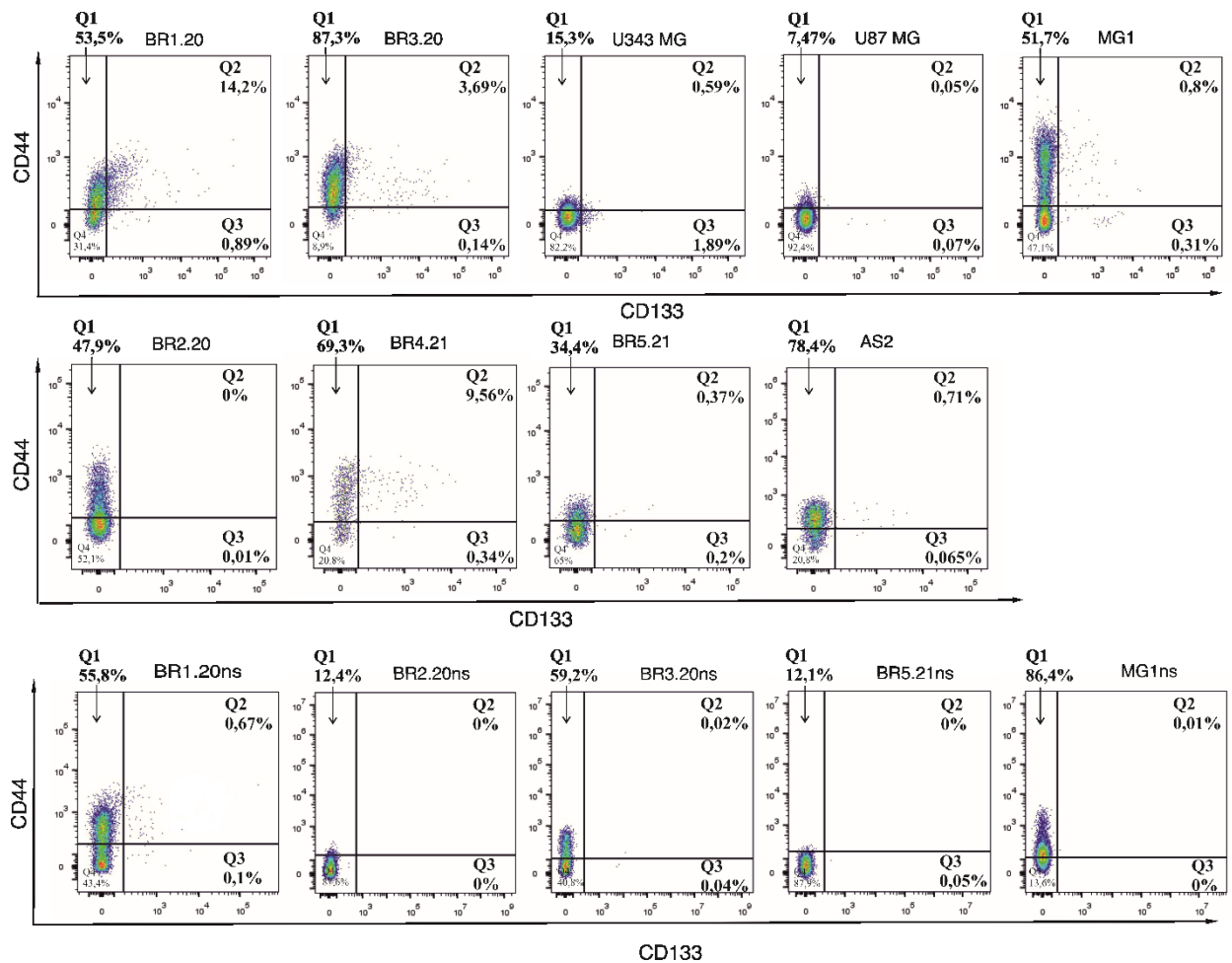


Рисунок Б1. Представленность CD133+, CD44+ и CD133+/CD44+ клеток в адгерентных культурах клеток глиом человека. Клетки инкубировали с PE-конъюгированными анти-CD133 и APC-конъюгированными анти-CD44 антителами и анализировали методом проточной цитометрии. Верхние квадранты (Q1, Q2) – популяция CD44-положительных клеток; правые квадранты (Q2, Q3) – популяция CD133-положительных клеток. Клетки, положительные по обоим маркерам, представлены в правом верхнем квадранте (Q2).

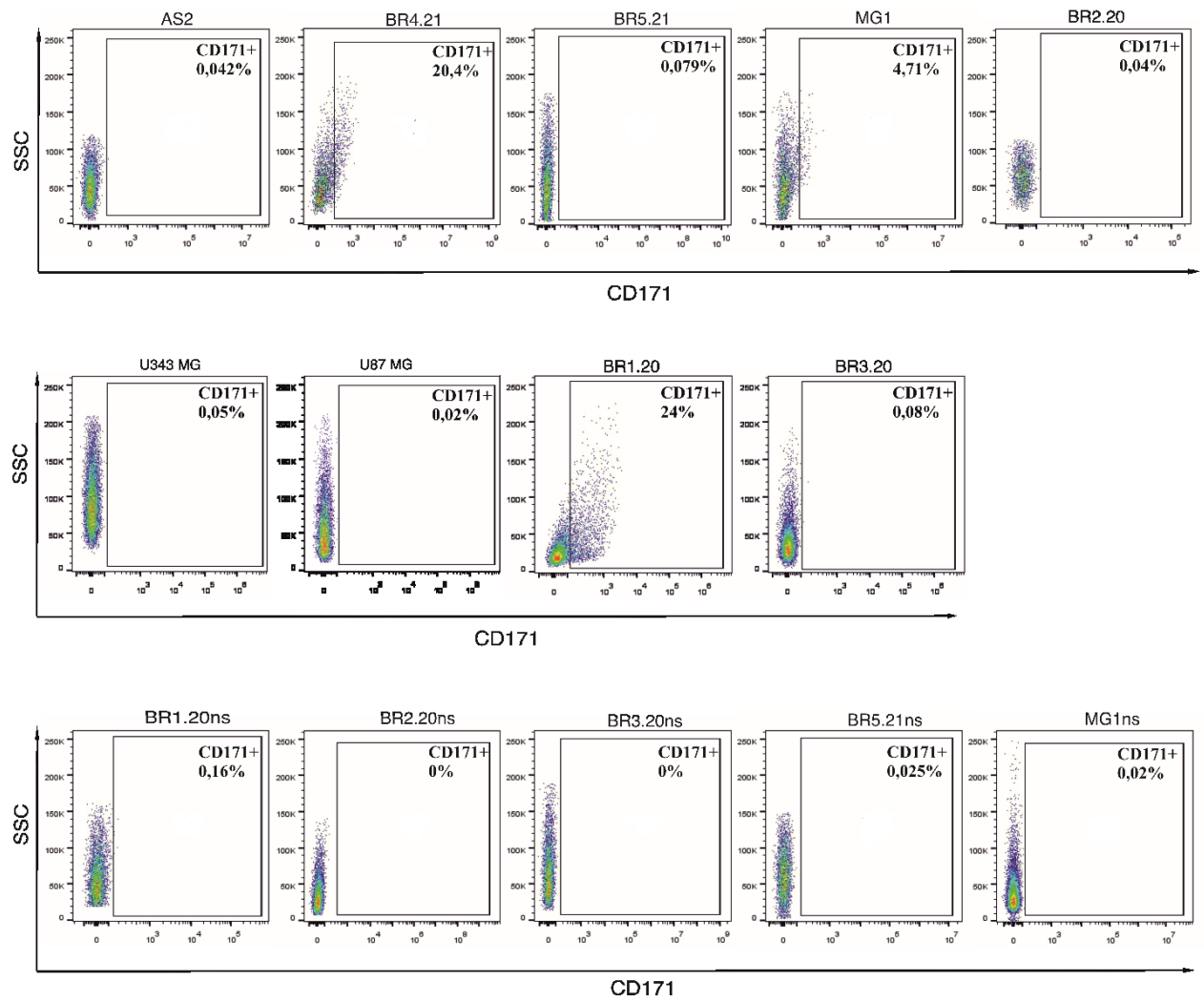


Рисунок Б2. Представленность CD171+ клеток в культурах клеток глиом человека. Клетки инкубировали с PE-конъюгированными анти-CD171 антителами и анализировали методом проточной цитометрии.

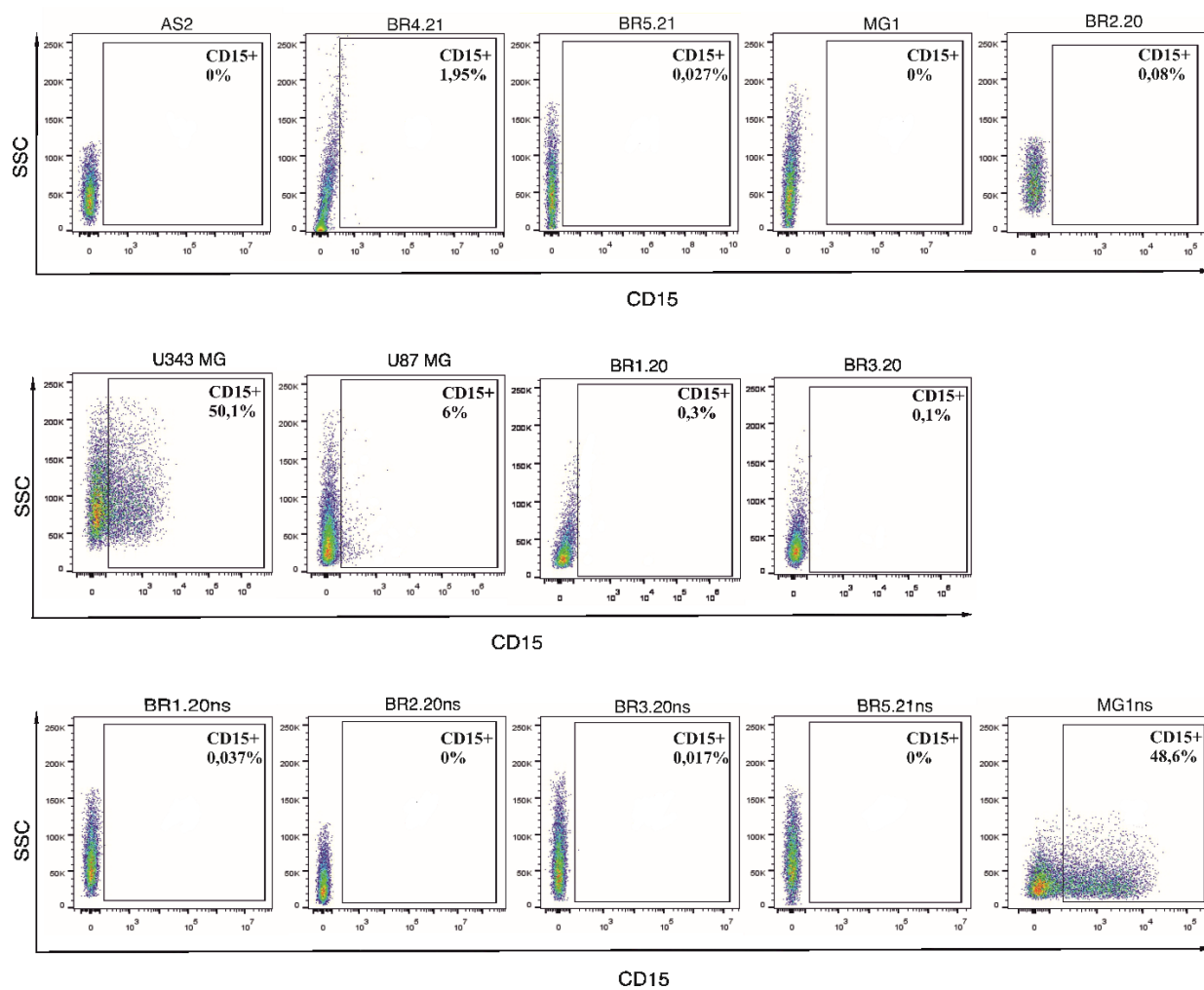


Рисунок Б3. Представленность CD15<sup>+</sup> клеток в культурах клеток глиом человека. Клетки инкубировали с FITC-конъюгированными анти-CD15 антителами и анализировали методом проточной цитометрии.



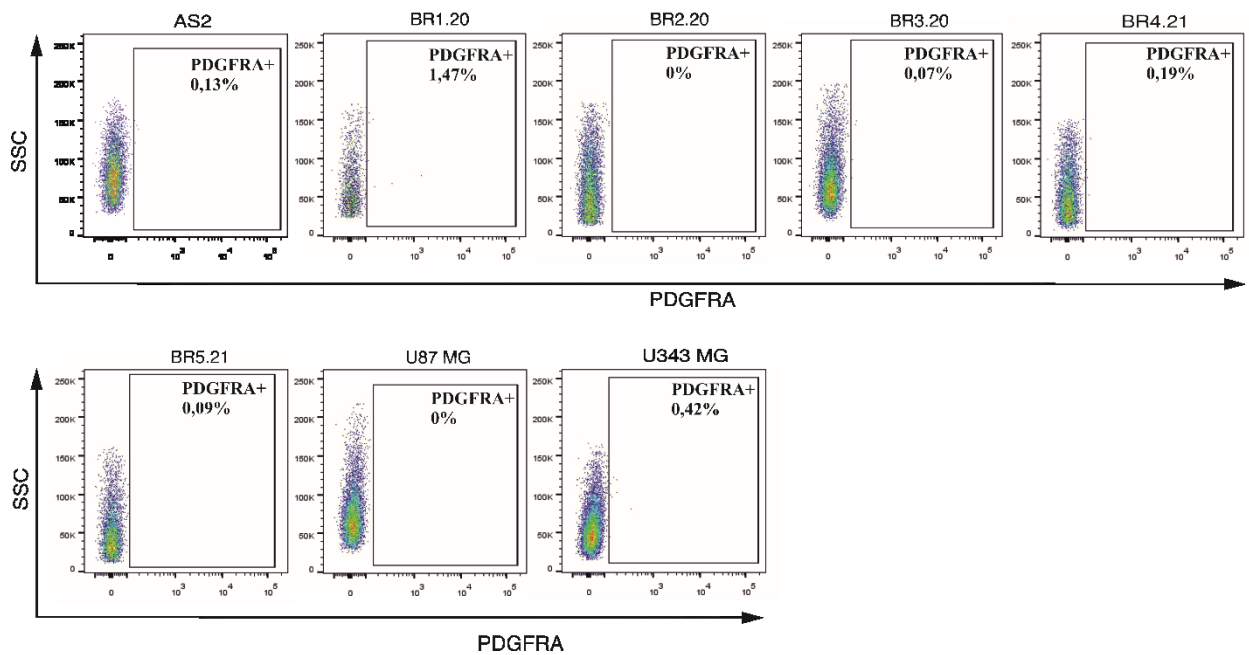


Рисунок Б4. Представленность PDGFRA+ клеток в культурах клеток глиом человека. Клетки глиом инкубировали с FITC-конъюгированными анти- PDGFRA антителами и анализировали методом проточной цитометрии.

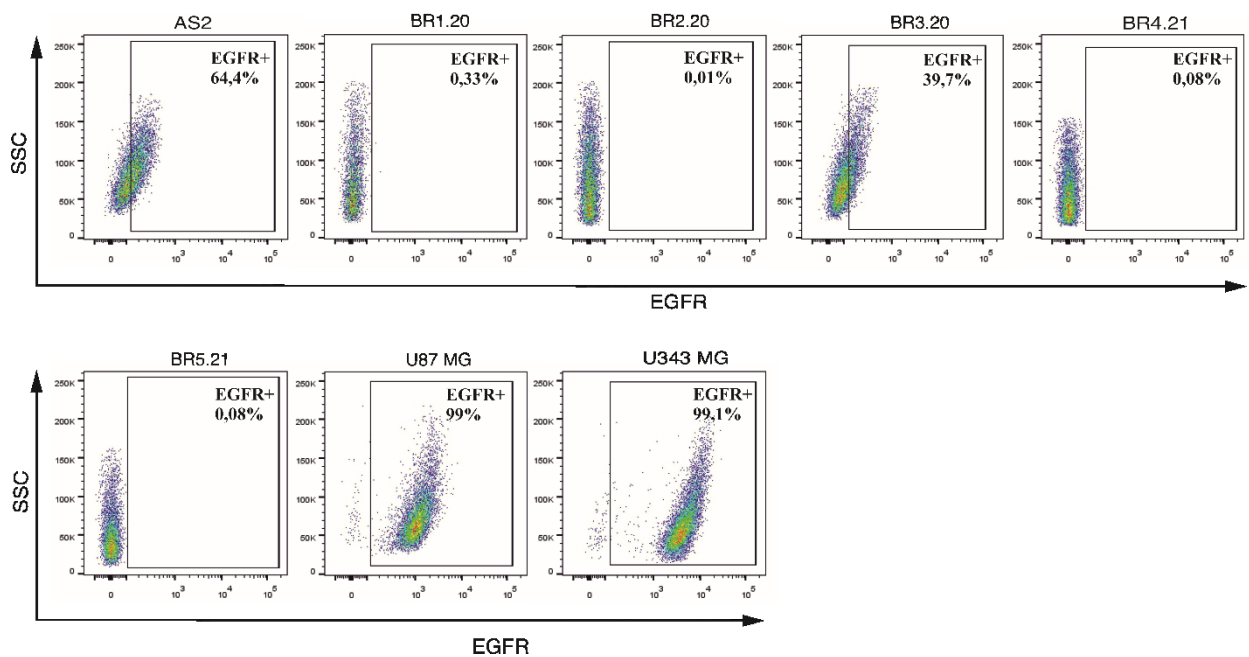


Рисунок Б5. Представленность EGFR+ клеток в культурах клеток глиом человека. Клетки инкубировали с моноклональными антителами к EGFR человека и вторичными антителами к IgG кролика, конъюгированными с флуорохромным красителем Alexa Fluor 647. Проточная цитометрия.

## Приложение В

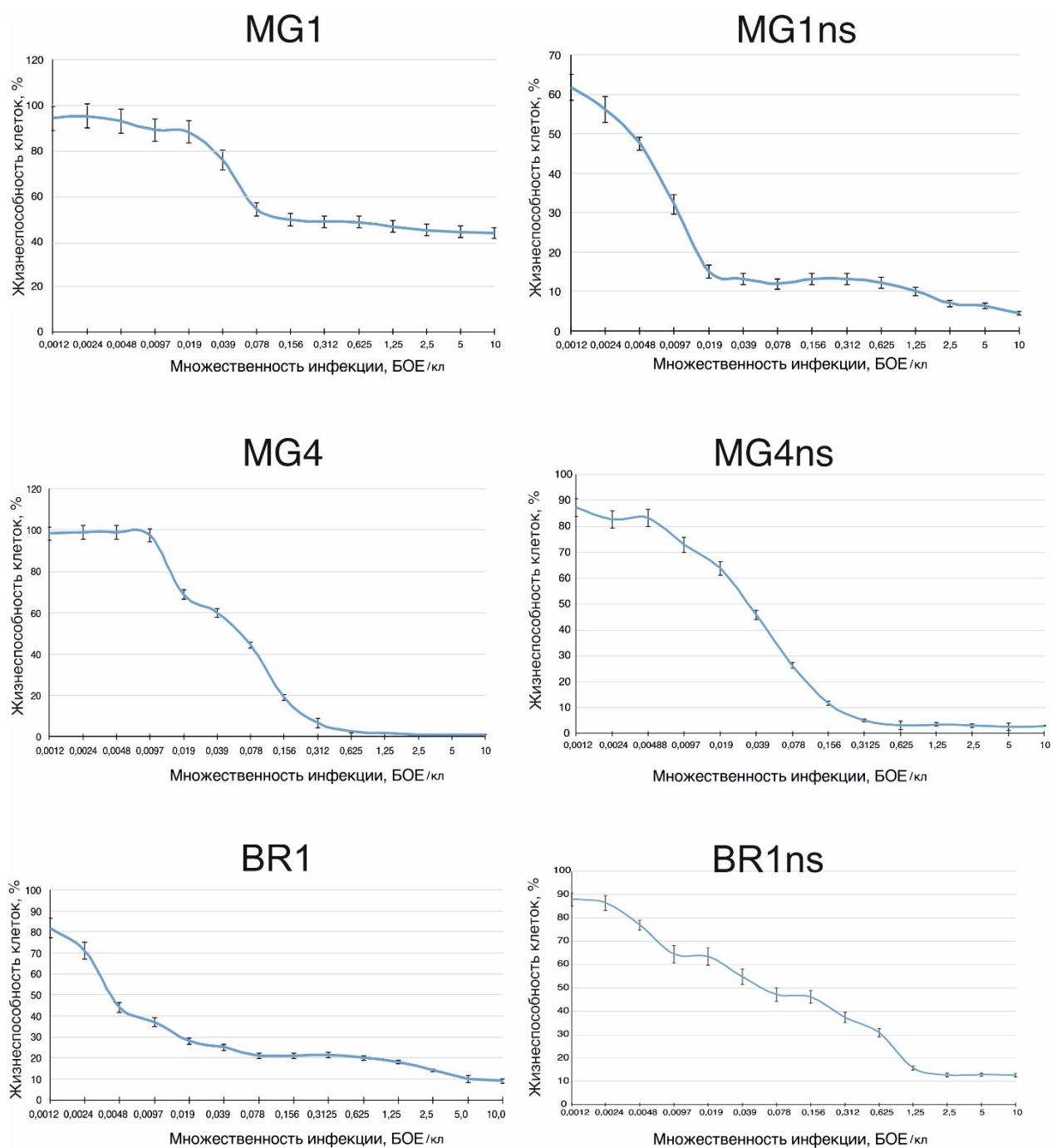


Рисунок Б1. Изменение жизнеспособности клеток глиом под действием онколитического вируса VV-GMCSF-Lact.

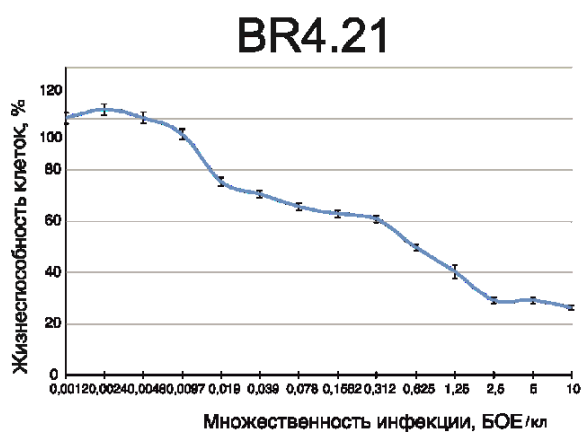
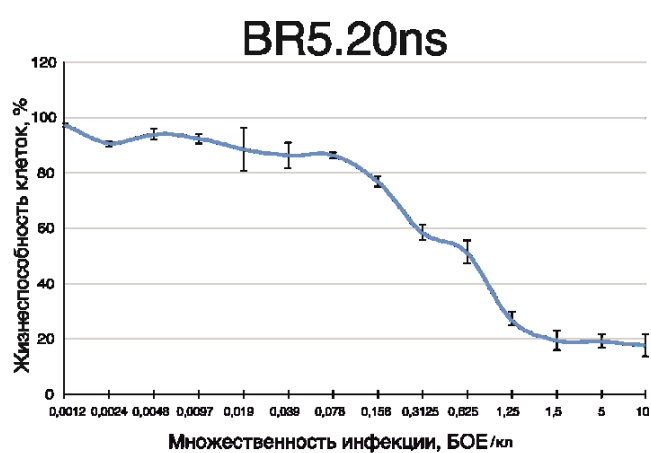
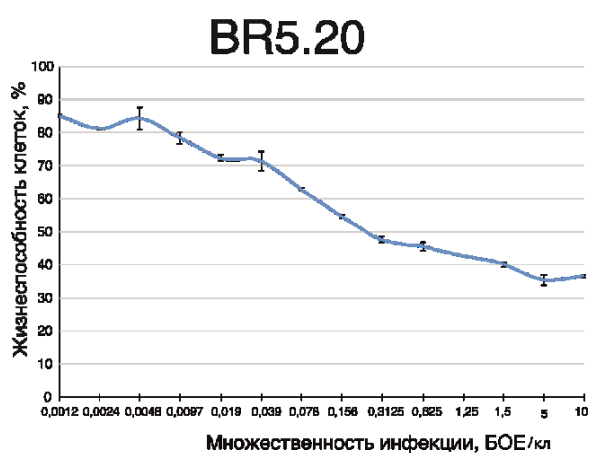
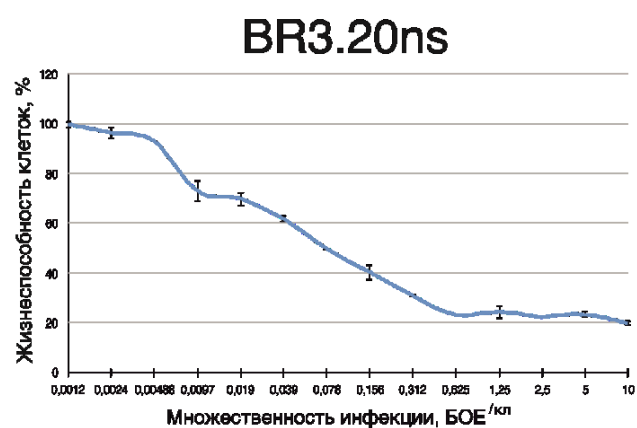
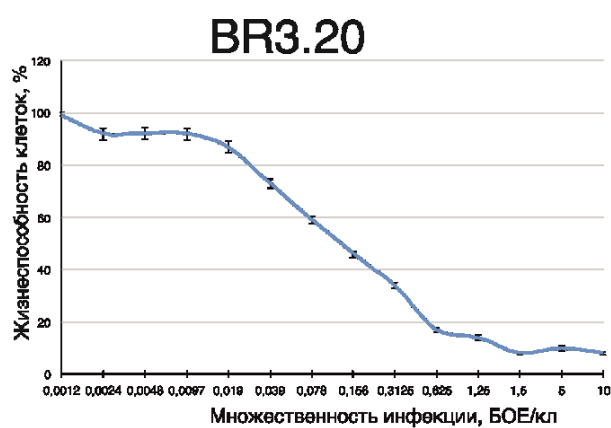


Рисунок В2. Изменение жизнеспособности клеток глиом под действием онколитического вируса VV-GMCSF-Lact.

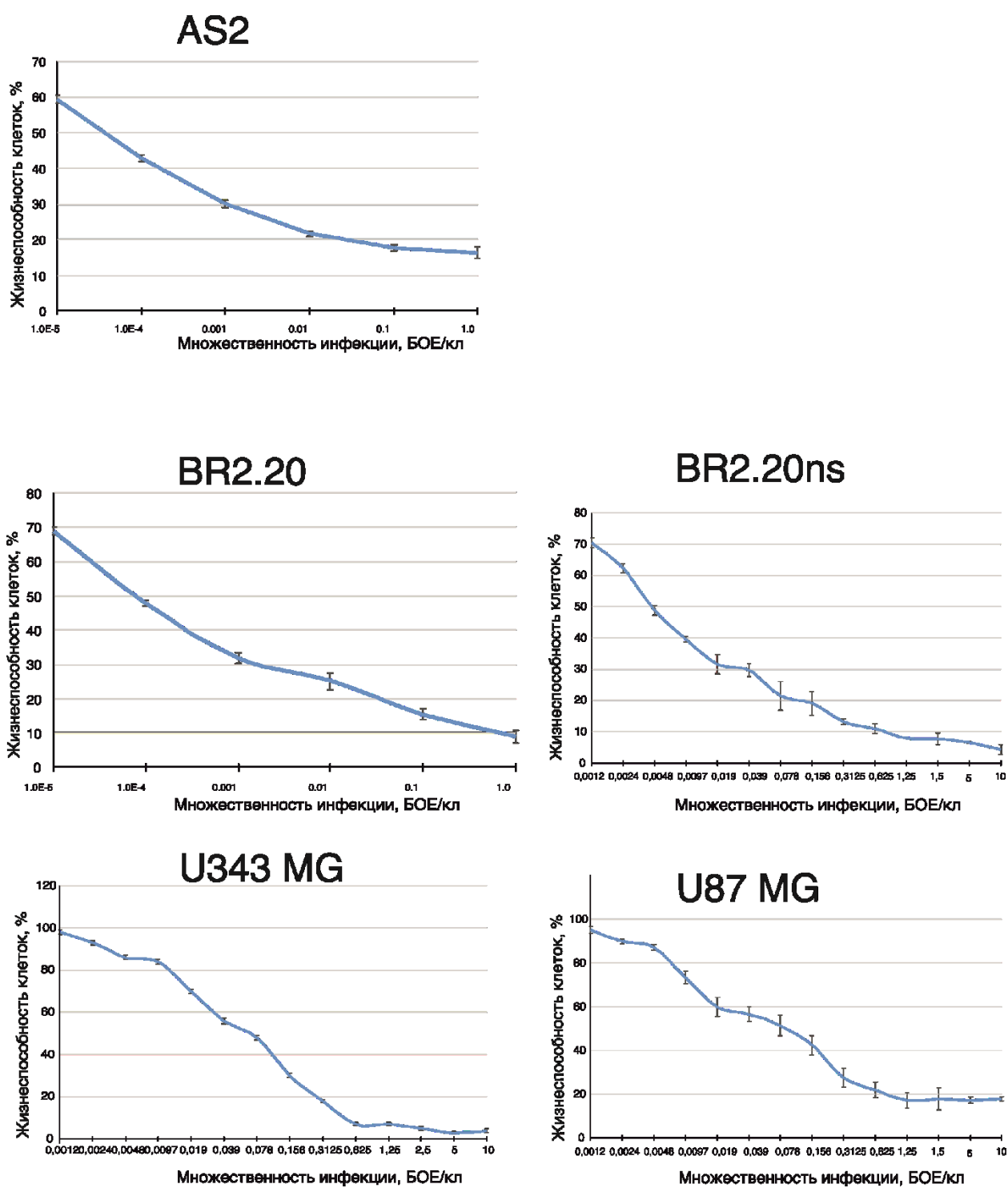


Рисунок В3. Изменение жизнеспособности клеток глиом под действием онколитического вируса VV-GMCSF-Lact.