

УДК 578.242, 578.831.11

Адаптация вируса болезни Ньюкасла к клеточным линиям с целью повышения онколитических свойств

К. С. Юрченко^{1*}, И. Цзин², А. М. Шестопапов¹¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

*E-mail: xenia7yurchenko@gmail.com

Поступила в редакцию 30.10.2018

Принята к печати 11.02.2019

РЕФЕРАТ Настоящая работа посвящена адаптации природных штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных от диких птиц, на опухолевых клетках человека. Большинство потенциальных онколитических вирусов относится к патогенным для человека видам. При манипуляции с генетическим материалом всегда есть риск получить вирус с нестабильным геномом. Решением может быть применение в качестве онколитических агентов природных апатогенных для человека вирусов. Вирус болезни Ньюкасла – возбудитель контагиозных заболеваний птиц, природные штаммы которого проявляют противоопухолевое действие и считаются безопасными для человека. Как показано в ряде работ, онколитические свойства природных штаммов можно повысить в процессе адаптации к культурам клеточных линий без вмешательства в геном вируса. В данной работе показано, что последовательные пассажи позволяют повысить инфекционный титр вируса на раковых клетках и привести к снижению жизнеспособности опухолевых клеток после инфицирования штаммом, адаптированным на этих клеточных линиях. Полученные результаты дополняют известные данные о процессе адаптации вируса болезни Ньюкасла к опухолевым клеткам человека. Таким образом, при адаптации вируса болезни Ньюкасла можно получить штамм с более выраженным онколитическим потенциалом, что необходимо учитывать при выборе стратегии разработки противоопухолевых препаратов на основе этого вируса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адаптация, вирус болезни Ньюкасла, онколитические свойства, опухолевые клетки, цитотоксическое действие.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВБН – вирус болезни Ньюкасла; ДМСО – диметилсульфоксид; ИФН – интерферон; ТЦД50 – 50%-тканевая цитопатическая доза; ФБС – фетальная бычья сыворотка; ЦТД – цитотоксическое действие; ВСЖ – вирусодержащая жидкость.

ВВЕДЕНИЕ

Виротерапия – это экспериментальный метод таргетной терапии злокачественных заболеваний с использованием онколитических вирусов, в том числе вируса болезни Ньюкасла (ВБН) (семейство Paramyxoviridae, род *Avulavirus*) для селективного уничтожения опухолевых клеток [1]. Онколитические вирусы избирательно инфицируют опухолевые клетки и используют их активированный синтетический аппарат для репликации, что вызывает цитотоксическое действие (ЦТД) и приводит к гибели клеток [2]. Нормальные здоровые клетки остаются при этом неповрежденными за счет развития раннего противовирусного интерферонового ответа, который предотвращает репликацию вирусного генома [3]. Вирус болезни Ньюкасла привлек к себе

внимание в качестве потенциального онколитического вируса в середине XX века и на сегодняшний день зарекомендовал себя как безопасный и эффективный противоопухолевый агент [4].

Штаммы ВБН для виротерапевтических исследований делят на литические и нелитические на основании свойств F-белка [5]. И литические, и нелитические штаммы могут действовать как мощные противораковые агенты. Преимущество литических штаммов обусловлено созданием инфекционного потомства за счет множественных циклов репликации и распространении цитотоксического эффекта в опухолевой ткани. Нелитические штаммы выполняют только один цикл репликации. Потомство нелитических штаммов содержит неактивные варианты F-белка, а противоопухолевые эффекты связаны

преимущественно со стимуляцией иммунного ответа [6].

Значительная часть исследований в области виротерапии посвящена созданию рекомбинантных штаммов для усиления противоопухолевых свойств вирусов. Однако разработка вирусных конструкций сопряжена с необходимостью контроля биологических свойств полученного вируса, его тропности, элиминации возможного инсерционного мутагенеза и рекомбинаций, связанных с восстановлением свойств изначально патогенных для человека вирусов [7, 8]. Природный онколитический потенциал штаммов ВБН, выделенных от диких птиц, позволяет использовать их для виротерапии без сложных модификаций генома. Различные лентогенные (низкопатогенные) и мезогенные (средней патогенности) штаммы ВБН изучали с 1960-х годов *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических исследованиях на онкологических больных [9].

Несмотря на популярность генно-инженерных методов, применяемых при разработке вирусных конструкций для виротерапии, природные немодифицированные штаммы также могут выступать мощным противоопухолевым агентом. Отмечено, что природные штаммы ВБН, в число которых входят и хорошо изученные и участвовавшие в клинических испытаниях штаммы 73-Т, МТН-68, PV701 и NDV-HUJ [10], проявляют высокую онколитическую активность. Все эти штаммы объединяет принадлежность к литическому типу вируса, который напрямую убивает клетки. Кроме того, вирулентные мезогенные штаммы способны индуцировать в опухолевых клетках более мощный апоптотический ответ, в отличие от апатогенных и низковирулентных штаммов [11, 12].

Нерекомбинантный, природный аттенуированный штамм PV701, полученный от мезогенного штамма МК107 (Gaithersburg, США) [13], обладает противоопухолевой активностью на широком спектре опухолей эпителиального, нейроэктодермального и мезенхимального происхождения [10]. Другой литический штамм МТН-68/Н, происходящий от природного штамма Hertfordshire (Herts'33), оказывает цитотоксический эффект на различных опухолевых клетках человека [10], а системное или локорегиональное введение вируса приводит к частичной, а в некоторых случаях полной регрессии первичных и метастатических опухолей [14, 15]. Адаптированный природный штамм 73-Т вызывает образование синцития и гибель широкого ряда злокачественных клеток *in vitro* и *in vivo* [16, 17]. При этом природные мезогенные штаммы, оказывающие цитотоксическое действие на злокачественные клетки, безопасны для нормальных клеток человека [12, 16–18].

Изучение механизма противоопухолевого цитотоксического действия вирусных изолятов привело к появлению предположения о возможности получения штамма с еще более выраженными литическими свойствами в ходе адаптации вируса к культуре клеток [19]. В процессе адаптации вирусов могут возникать варианты, способные к более эффективному размножению в клетках-хозяевах, чем вирус дикого типа. С одной стороны, есть опасение, что при увеличении инфекционности вируса к адаптированным клеткам будет происходить снижение его вирулентности [20, 21], что, вероятно, может отрицательно сказаться на онколитических свойствах. С другой стороны, адаптация вируса к конкретной клеточной линии может приводить к усилению цитотоксического потенциала адаптированного вируса на этих клетках [22].

Так, полученный методом серийных ($n = 38$) пассажей на клетках асцитной карциномы Эрлиха штамм на основе природного MD20Z (США, 1945) проверили на модели *in vivo*. Общая недельная выживаемость мышей с асцитными опухолями после терапии вирусом поздних пассажей увеличивалась с 0 до 63.6%, при этом вирус активно реплицировался в опухолевых клетках и вызывал цитотоксический эффект быстрее, чем природный штамм [23]. Cassel W.A. и Garrett R.E. в своих исследованиях подтвердили усиление онколитического эффекта после адаптации вируса ВБН 379-SI, полученного из природного штамма MD20Z методом серийных ($n = 73$) пассажей на клетках асцитной карциномы Эрлиха *in vitro* и затем 13 пассажей *in vivo* [24]. В дальнейшем в США был проведен ряд успешных клинических испытаний аллогенных и аутологических вакцин на основе штамма ВБН 73-Т при метастатической меланоме [25].

Таким образом, учитывая данные, подтверждающие успешную адаптацию природных штаммов с усиленным противоопухолевым эффектом при последовательном пассировании, мы изучили адаптацию природных штаммов ВБН различного патотипа на линиях опухолевых клеток человека с целью проверки эффективности цитотоксических свойств, полученных при пассировании штаммов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеточных линий и штаммы вируса болезни Ньюкасла

В работе использованы перевиваемые клеточные культуры: Vero – линия клеток эпителия почки африканской зеленой марышки, НСТ116 – линия клеток колоректального рака (Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл.); HeLa – ли-

ния клеток рака шейки матки (НИИ клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск); MCF7 – линия клеток аденокарциномы молочной железы (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург); A549 – линия клеток немелкоклеточного рака легкого (Клиника иммунопатологии Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск).

Для культивирования клеток Vero и опухолевых культур использовали ростовую среду ДМЕМ, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 50 ед/мл гентамицина. Клетки культивировали в культуральных флаконах (25 см²) в стандартных условиях (при 37°С в атмосфере с 5% содержанием CO₂).

Штаммы вируса болезни Ньюкасла

В работе использовали четыре штамма ВВН: два вирулентных мезогенных штамма ВВН, выделенных на территории РФ от сизых голубей – NDV/Altai/pigeon/770/2011 [26] и NDV/Altai/pigeon/777/2010 [27], и два лентогенных штамма – NDV/mallard/Amur/264/2009 и NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, выделенных от кряквы и чирка-свистунка соответственно.

Подготовка штаммов вируса болезни Ньюкасла

Штаммы вируса были наработаны в аллантоисной жидкости 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов. Наличие вируса подтверждали в реакции гемагглютинации (РГА) с эритроцитами петуха и определяли титр гемагглютинина каждого штамма вируса по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ [28].

Титрование вируса болезни Ньюкасла в культуре клеток Vero (ТЦД50)

Титрование вируса болезни Ньюкасла на чувствительной к цитопатическому действию ВВН культуре клеток Vero проводили согласно [29]. Клеточную суспензию рассеивали в ростовой среде на 96-луночные планшеты в концентрации 30000 клеток на лунку и культивировали в стандартных условиях.

Суточный монослой клеток отмывали раствором Хенкса и вносили 10-кратные разведения вируса на поддерживающей среде Игла-МЕМ с добавлением 1% ФБС. Планшеты инкубировали в стандартных условиях в течение 1 ч для адсорбции вируса, затем меняли вирусосодержащую жидкость (ВСЖ) на поддерживающую среду. Ежедневно под микроскопом контролировали состояние монослоя клеток на наличие ЦТД. Окончательный учет титрования проводили на 4-е сутки. Инфекционный титр вируса для культуры клеток Vero рассчитывали по мето-

ду Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lgТЦД50/мл [30].

Последовательные пассирования штаммов ВВН на перевиваемой клеточной линии Vero и опухолевых клеточных линиях человека

Подготовку клеточной культуры и инфицирование 10-кратными разведениями вируса проводили так же, как при методе титрования. На 4-е сутки после инфицирования подсчитывали инфекционный титр и собирали ВСЖ крайних разведений. После чего проводили следующий пассаж с инфицированием клеток Vero собранным крайним разведением с использованием того же метода. Таким образом проводили 11 пассажей и рассчитывали инфекционный титр каждого пассажа.

Оценка жизнеспособности клеточных линий после инфицирования штаммами ВВН колориметрическим методом (МТТ-тест)

Жизнеспособность клеток всех опухолевых линий человека определяли с помощью МТТ-теста на 4-е сутки после инфицирования штаммами вируса. Суточный монослой опухолевых клеток на 96-луночном планшете отмывали раствором Хенкса и инкубировали с вирусами (титр 8 ГАЕ на 10000 клеток) в течение 1 ч в стандартных условиях. Далее клетки промывали раствором Хенкса и инкубировали в 200 мкл поддерживающей среды в течение 4 суток в стандартных условиях. Контрольные опухолевые клетки без вируса инкубировали в поддерживающей среде.

На 4-е сутки клетки отмывали раствором Хенкса. Рабочий раствор МТТ массовой концентрации 5 мг/мл на основе поддерживающей среды добавляли в объеме 100 мкл в лунку и инкубировали в течение 4 ч в стандартных условиях. Далее меняли раствор МТТ на ДМСО (150 мкл на лунку) и инкубировали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. Оптическую плотность измеряли при длине волны 540 и 630 нм на микропланшетном фотометре Lonza Biotek ELX808 Absorbance Microplate Reader (США). Жизнеспособность клеток оценивали по соотношению относительной доли живых и контрольных клеток, не обработанных вирусом, по формуле: $(V_{540} - V_{630}) / (K_{540} - K_{630}) \times 100\%$, где V – показатели зараженных вирусом лунок, а K – показатели контрольных лунок.

Инфицирование клеток опухолевых линий человека мезогенными штаммами ВВН для оценки репликативной активности вируса на разных опухолевых клетках

Репликативную активность штаммов ВВН на разных опухолевых клеточных линиях оценивали методом

титрования на клетках НСТ116, HeLa, A549, MCF7 после инфицирования штаммами ВБН.

Клетки опухолевых линий человека и контрольную культуру клеток Vero высевали в ростовой среде в культуральные флаконы (25 см²) и культивировали в стандартных условиях. Суточный монослой клеток дважды отмывали раствором Хенкса и инкубировали с вирусами в объеме 1 мл (титр 8 ГАЕ на 10000 клеток) с адсорбцией в течение 45 мин в стандартных условиях. Затем дважды промывали раствором Хенкса и добавляли свежую поддерживающую среду в объеме 10 мл и инкубировали в стандартных условиях. На 3, 6, 24, 48, 72 ч после заражения клеток штаммами ВБН инфекционный титр культуральной среды определяли титрованием в соответствующих опухолевых и модельной клеточной культуре общепринятым методом.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. На основании *t*-критерия по таблице Стьюдента определяли вероятность различия сравниваемых средних величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы вируса болезни Ньюкасла были наработаны в аллантоисной жидкости 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов. Присутствие вируса в аллантоисной жидкости подтверждено в реакции РГА с эритроцитами петуха, инфекционный титр вируса определен на клеточной линии Vero (табл. 1). Показан высокий титр мезогенных штаммов, выделенных от сизых голубей, в реакции РГА и при титровании на клетках Vero.

На следующем этапе использовали две возможных системы повышения противоопухолевых свойств вируса болезни Ньюкасла. Первая система заключалась в пассировании штаммов ВБН на перевиваемой чувствительной клеточной линии Vero с адаптацией

Таблица 1. Титры природных штаммов вируса болезни Ньюкасла

Штамм	РГА/50 мкл	lgТЦД50/мл
NDV/Altai/pigeon/770/2011	512	6.7
NDV/Altai/pigeon/777/2010	256	6.5
NDV/mallard/Amur/264/2009	64	3.0
NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010	64	3.0

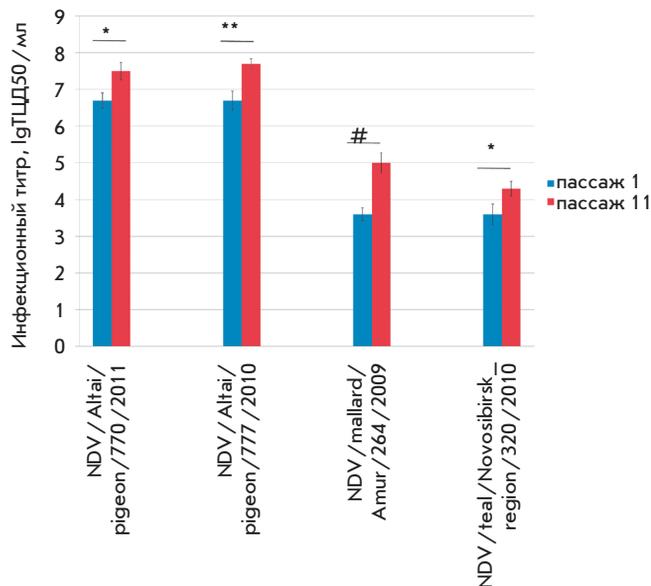


Рис. 1. Повышение значения инфекционного титра штаммов вируса болезни Ньюкасла в процессе адаптации к перевиваемой клеточной культуре Vero. * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, # $p = 0.001$ (*t*-критерий Стьюдента)

вируса к данной линии и последующей проверкой жизнеспособности опухолевых клеточных линий после инфицирования адаптированными штаммами ВБН. Клетки Vero не синтезируют ИФН α и ИФН β , что позволяет вирусу болезни Ньюкасла беспрепятственно размножаться с высвобождением нового вирусного потомства и формировать ЦТД.

Вторая система заключается в адаптации штаммов к опухолевым линиям с оценкой динамики изменения жизнеспособности опухолевых клеток при инфицировании адаптированными штаммами вируса на поздних пассажах.

Согласно первой схеме, за 11 пассажей на клеточной линии Vero мезогенные штаммы NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010, титр которых изначально был на несколько порядков выше, чем у лентогенных штаммов, и составлял 6.7 lgТЦД50/мл после первого пассажа, повысился до 7.5 и 7.7 lgТЦД50/мл соответственно (табл. 2, рис. 1). Не удалось достичь значения титра лентогенных штаммов NDV/mallard/Amur/264/2009 и NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, схожего с титром мезогенных штаммов на поздних пассажах, несмотря на то, что титры выросли с 3.6 до 5.0 lgТЦД50/мл и с 3.6 до 4.3 lgТЦД50/мл соответственно. Вероятно, на способность вируса эффективно реплицироваться в клеточной культуре с образованием ЦТД влияет не только наличие «вирулентной» последовательности в сайте расщепления F-белка, но и принадлежность к патотипу,

Таблица 2. Динамика изменения титра штаммов вируса болезни Ньюкасла в процессе адаптации к перевиваемой клеточной культуре Vero

Штамм ВБН	Пассаж										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
NDV/Altai/pigeon/770/2011	6.7± 0.21	6.8± 0.52	6.7± 0.39	6.9± 0.15	6.9± 0.18	6.9± 0.23	7.0± 0.25	7.5± 0.31	7.5± 0.14	7.5± 0.34	7.5± 0.24
NDV/Altai/pigeon/777/2010	6.7± 0.26	6.7± 0.28	6.9± 0.31	6.9± 0.21	7.0± 0.19	7.0± 0.23	7.2± 0.33	7.7± 0.23	7.7± 0.21	7.7± 0.40	7.7± 0.14
NDV/mallard/Amur/264/2009	3.6± 0.18	3.6± 0.19	3.8± 0.22	3.8± 0.25	4.5± 0.24	4.7± 0.36	4.7± 0.33	5.0± 0.40	5.1± 0.36	5.0± 0.22	5.0± 0.28
NDV/teal/Novosibirsk_ region/320/2010	3.6± 0.28	3.6± 0.21	3.8± 0.18	3.7± 0.19	4.3± 0.31	4.2± 0.14	4.3± 0.29	4.3± 0.18	4.3± 0.26	4.4± 0.33	4.3± 0.20

Примечание. Представлено среднее значение ± стандартное отклонение.

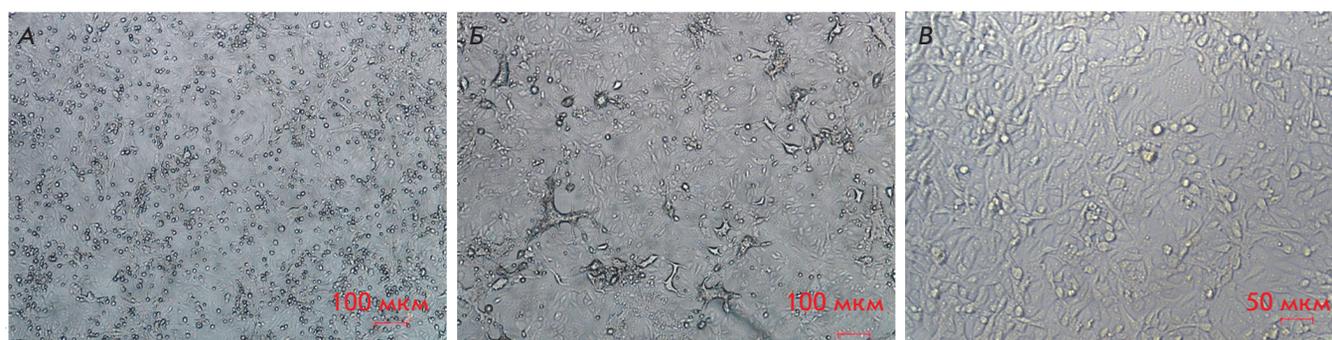


Рис. 2. Цитотоксическое действие ВБН NDV /Altai/pigeon/770/2011 на перевиваемой клеточной линии Vero, 7-й пассаж. А – инфицированная клеточная линия на 3-и сутки после инкубации с вирусом; Б – инфицированная клеточная линия на 4-е сутки после инкубации с вирусом; В – образование синцития в инфицированной клеточной линии на 2-е сутки после инкубации с вирусом

напрямую связанная с цитолитической способностью, так как все исследуемые штаммы содержат «вирулентную» последовательность сайта, но только NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010 относятся к мезогенному типу [26, 27].

В процессе адаптации к клеточной линии Vero титр всех исследуемых штаммов вируса увеличивался и после 7–8-го пассажей не изменялся. Помимо увеличения инфекционного титра при постановке ТЦД50 отмечено нарастание морфологических изменений клеточного монослоя в культуре. При инфицировании мезогенными штаммами вируса на 1–3-м пассажах на Vero на 2–3-й день культивирования в клеточной культуре наблюдается цитотоксическое действие вируса с образованием областей с округлившимися погибшими клетками, которые открепляются от поверхности культурального планшета с распространением ЦТД на весь монослой к 4-м суткам. На последующих 5–11-ти пассажах помимо погибших округлившихся клеток, стандартного проявления цитотоксического действия вируса, в процессе вирусной репликации в клеточном монослое на 3–4-е сутки

образуются тяжи клеточных агломератов. К 7–10-му пассажу на 2–3-и сутки появляются структуры, похожие на синцитий, характерные для ЦТД при инфицировании парамиксовирусами (рис. 2). При этом, несмотря на различие в проявлении ЦТД на разных пассажах, максимальное поражение монослоя составляло примерно до 90% независимо от пассажа, а деструктивные изменения были наиболее выражены, как правило, на 4-е сутки после инфицирования.

Образование синцития, что характерно для культивирования разных представителей семейства парамиксовирусов, отмечено только в единичных случаях: штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 на 7-м пассаже на клетках Vero (рис. 2В) и штамма NDV/mallard/Amur/264/2009 на 10-м пассаже на 2-е и 3-и сутки соответственно, но не наблюдалось при первичном пассировании вируса на клетках Vero.

Не отмечено морфологических изменений монослоя в процессе пассирования лентогенных штаммов NDV/mallard/Amur/264/2009 и NDV/teal/Novosibirsk_region/320/2010, кроме одного случая образования синцития в монослое.

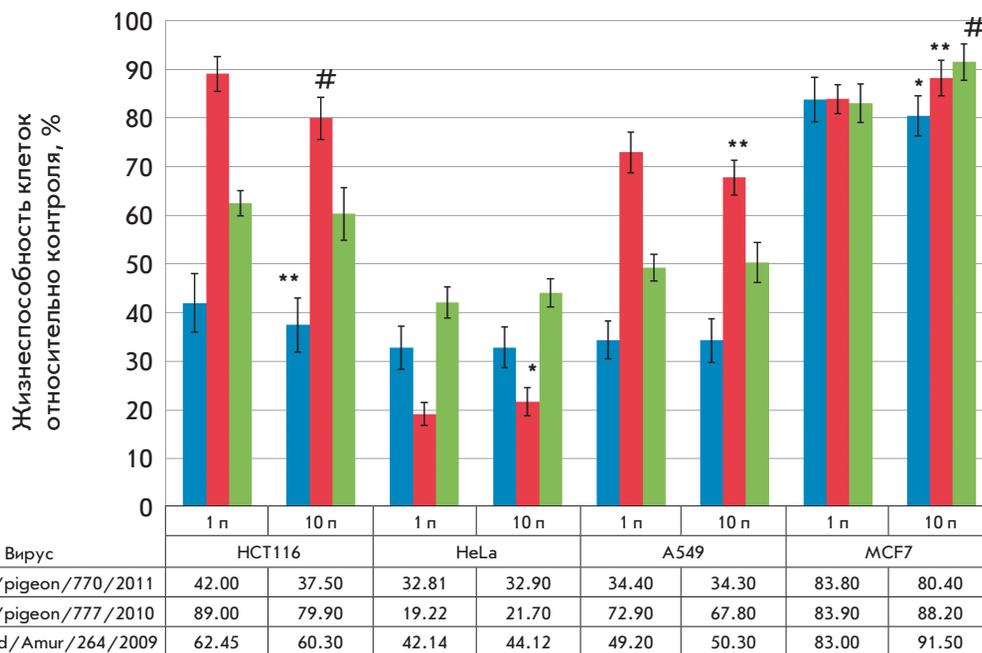


Рис. 3. Сравнительная оценка жизнеспособности опухолевых клеточных линий человека в зависимости от инфицирования штаммами ВБН 1-го (1 п) и 10-го (10 п) пассажа на Vero. МТТ-тест, * $p = 0.05$, ** $p = 0.01$, # $p = 0.001$ (t-критерий Стьюдента)

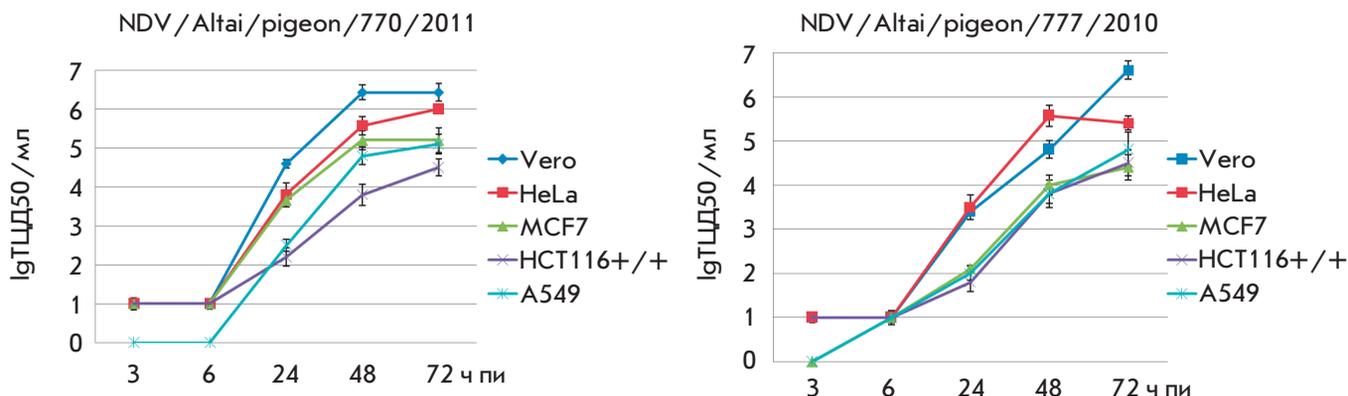


Рис. 4. Динамика репликативной активности штаммов вируса болезни Ньюкасла на чувствительной культуре Vero и опухолевых клеточных линиях человека. ч пи – часы после инфицирования

Адаптированные мезогенные штаммы NDV/Altai/pigeon/770/2011, NDV/Altai/pigeon/777/2010 и лентогенный штамм NDV/mallard/Amur/264/2009 на 10-м пассаже использовали для сравнительной оценки противоопухолевых свойств на перевиваемых линиях опухолевых клеток – HCT116, HeLa, A549, MCF7.

Множественность инфицирования опухолевых клеточных линий составила 8 ГАЕ/10000 клеток. Выживаемость клеточных линий после инфицирования оценивали в МТТ-тесте на 4-е сутки (рис. 3).

Сравнение жизнеспособности линий опухолевых клеток, инфицированных штаммами вируса 1-го и 10-го пассажей на линии клеток Vero, не выявило значительного увеличения противоопухолевой

активности ВБН, за исключением клеточной линии HCT116, жизнеспособность клеток которой снизилась на 5.0 и 9.9% после инфицирования NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010 в 10-м пассаже на Vero соответственно.

На следующем этапе работы штаммы адаптировали на каждой опухолевой линии, чтобы проверить увеличится ли их противоопухолевый потенциал при адаптации на конкретной опухолевой линии.

Определена динамика репликативной активности мезогенных штаммов на всех опухолевых клеточных линиях, в том числе на линии клеток Vero в качестве положительного контроля (рис. 4). Титрование ВСЖ, собранной на 3, 6, 24, 48 и 72 ч, штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 показало динамику роста титра ви-

Таблица 3. Динамика изменения титра штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 в процессе адаптации к перевиваемым опухолевым клеточным культурам

Опухолевые клеточные линии	Пассаж										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
НСТ116	4.5± 0.33	4.6± 0.32	4.6± 0.47	4.6± 0.40	5.0± 0.60	5.4± 0.28	5.2± 0.39	5.6± 0.41	6.0± 0.14	6.4± 0.63	6.4± 0.56
HeLa	6.0± 0.54	5.8± 0.44	5.6± 0.61	5.8± 0.56	5.8± 0.36	5.4± 0.42	6.0± 0.55	6.0± 0.61	6.2± 0.21	6.8± 0.61	6.6± 0.78
A549	5.1± 0.58	5.4± 0.41	5.2± 0.37	5.6± 0.26	5.8± 0.33	5.8± 0.29	5.8± 0.34	5.8± 0.36	6.2± 0.36	6.0± 0.52	6.0± 0.45
MCF7	5.2± 0.43	5.2± 0.43	5.2± 0.51	5.0± 0.44	5.6± 0.49	5.8± 0.52	5.8± 0.55	5.8± 0.32	5.8± 0.26	5.8± 0.48	5.8± 0.36

Примечание. Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

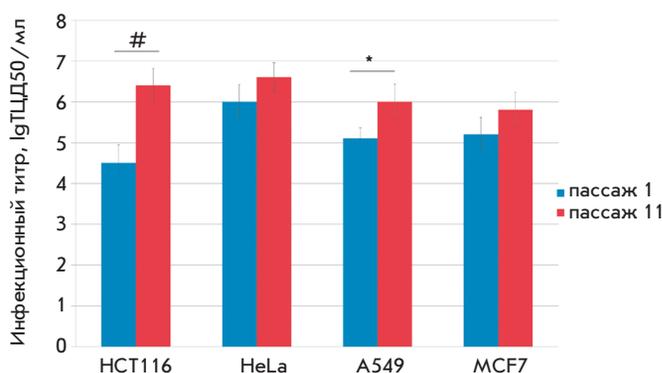


Рис. 5. Повышение инфекционного титра штаммов вируса болезни Ньюкасла в процессе адаптации к перевиваемым линиям опухолевых клеток человека, * $p = 0.05$, # $p = 0.001$ (t -критерий Стьюдента)

руса – наибольший титр на 3-и сутки получен на клеточной культуре Vero, наименьший – на клеточной линии НСТ116. Схожие данные получены для штамма NDV/Altai/pigeon/777/2010, а наименьший титр получен на клеточных линиях НСТ116 и МСF7.

Штаммы NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010 сходны по своим параметрам и репликативной активности, поэтому для дальнейшей работы по адаптации вируса к клеточным опухолевым линиям с целью повышения онколитического потенциала был выбран один штамм – NDV/Altai/pigeon/770/2011. Этот штамм пассировали на опухолевых клеточных линиях до 11-го пассажа как описано выше (табл. 3, рис. 5).

Увеличение титра наблюдали при пассировании вируса (пассажи 1–11) на клетках: НСТ116 – на 1.9 lgTCID50/мл, HeLa – на 0.6 lgTCID50/мл, А549 – на 0.9 lgTCID50/мл, МСF7 – на 0.6 lgTCID50/мл. Однако только в случае клеточной линии НСТ116 можно говорить о нарастании титра почти на 2 порядка в ре-

зультате адаптации штаммов. Жизнеспособность клеточных опухолевых линий после инфицирования штаммами 10-го пассажа, наработанными на опухолевых клетках НСТ116, HeLa и А549 снизилась на 1.6, 4.1 и 6.0% соответственно, а в случае клеток МСF7 повысилась на 0.8% (рис. 6).

Возможно, для адаптации на опухолевых клетках необходима другая методика, включающая культивирование в более высоких пассажах или пассирование в аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов и в комбинации *in vitro*.

Таким образом, прямая взаимосвязь между динамикой наработки вируса в опухолевых клеточных линиях и эффективностью противоопухолевого действия путем прямого онколизиса этих клеток, вероятно, отсутствует, что может подтверждать существование различий в чувствительности каждой конкретной клеточной линии к онколитическому действию вируса. Так, удалось добиться снижения жизнеспособности клеток НСТ116 на 5 и 10% после их инфицирования штаммами NDV/Altai/pigeon/770/2011 и NDV/Altai/pigeon/777/2010, которые пассировали на перевиваемой культуре клеток Vero. Возможно, клеточная линия НСТ116 более чувствительна к инфицированию адаптированными штаммами и для усиления эффекта необходимо более длительное пассирование штаммов, возможно, в комбинации с пассированием в аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптация вируса может служить способом повышения инфекционного титра для последующего использования вируса в качестве противоопухолевого агента с более выраженными онколитическими свойствами. Чувствительная культура клеток Vero может использоваться для наработки природных штаммов ВБН. Адаптация штаммов ВБН на клеточной культу-

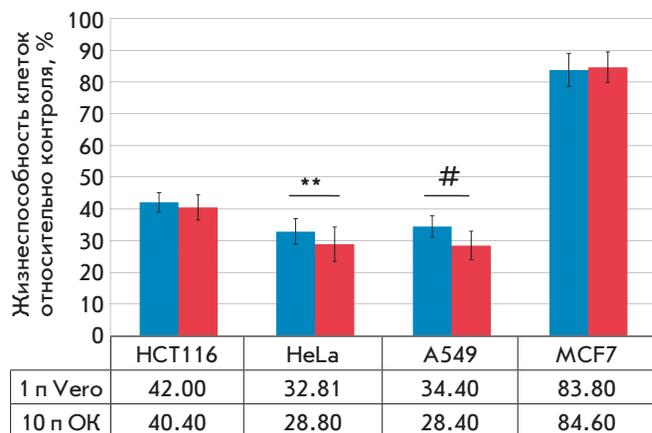


Рис. 6. Сравнительная оценка жизнеспособности опухолевых клеточных линий человека в зависимости от инфицирования штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 1-го (1 п) пассажа на Vero и 10-го (10 п) пассажа на опухолевых клетках (ОК), МТТ-тест, ** $p = 0.01$, # $p = 0.001$ (t -критерий Стьюдента)

ре Vero (11 пассажей) приводит к статистически значимому повышению титра вируса независимо от его вирулентности и уровня начального титра: средний инфекционный титр повысился на 0.8 и 1.1 lgТЦД50/мл у мезогенных штаммов и на 0.7 и 1.4 lgТЦД50/мл у лентогенных.

Снижение жизнеспособности опухолевых клеток, чувствительных к ВВН в 1-м пассаже, после инфицирования адаптированным на этих линиях штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 в 11-м пассаже и невосприимчивость резистентной линии MCF7 как к ВВН в 1-м пассаже, так и к ВВН в 11-м пассаже на MCF7, свидетельствуют о возможности повышения онкологических свойств путем адаптации штаммов и необходимостью оптимизации пассирования. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00139.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Buijs P.R., Verhagen J.H., van Eijck C.H., van den Hoogen B.G. // Hum. Vaccin. Immunother. 2015. V. 11. № 7. P. 1573–1584.
- Schirmacher V. // Expert Opin. Biol. Ther. 2015. V. 15. № 12. P. 1757–1771.
- Biswas M., Kumar S.R., Allen A., Yong W., Nimmanapalli R., Samal S.K., Elankumaran S. // Viral Immunol. 2012. V. 25. № 4. P. 268–276.
- Schirmacher V. // Biomedicines. 2016. V. 4. № 3. P. pii: E16.
- Schirmacher V., Fournier P. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 542. P. 565–605.
- Ginting T.E., Suryatenggara J., Christian S., Mathew G. // Oncolytic Virother. 2017. V. 6. P. 21–30.
- Chen N., Bellone C.J., Schriewer J., Owens G., Fredrickson T., Parker S., Buller R.M. // Virology. 2011. V. 409. № 2. P. 328–337.
- Lee P., Knight R., Smit J.M., Wilschut J., Griffin D.E. // J. Virol. 2002. V. 76. № 12. P. 6302–6310.
- PDQ Integrative, Alternative, and Complementary Therapies Editorial Board. Newcastle Disease Virus (PDQ®): Health Professional Version. 2018 Aug 22. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65752/>
- Lam H.Y., Yeap S.K., Rasoli M., Omar A.R., Yusoff K., Suraini A.A., Alitheen N.B. // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. P. 718710.
- Ghrichi M., El Zowalaty M., Omar A.R., Ideris A. // Int. J. Mol. Med. 2013. V. 31. № 3. P. 525–532.
- Bian J., Wang K., Kong X., Liu H., Chen F., Hu M., Zhang X., Jiao X., Ge B., Wu Y., Meng S. // Arch. Virol. 2011. V. 156. № 8. P. 1335–1344.
- Pecora A.L., Rizvi N., Cohen G.I., Meropol N.J., Stermann D., Marshall J.L., Goldberg S., Gross P., O'Neil J.D., Groene W.S., et al. // J. Clin. Oncol. 2002. V. 20. № 9. P. 2251–2266.
- Csatary L.K., Bakács T. // JAMA. 1999. V. 281. № 17. P. 1588–1589.
- Apostolidis L., Schirmacher V., Fournier P. // Int. J. Oncol. 2007. V. 31. № 5. P. 1009–1019.
- Reichard K.W., Lorence R.M., Cascino C.J., Peeples M.E., Walter R.J., Fernando M.B., Reyes H.M., Greager J.A. // J. Surg. Res. 1992. V. 52. № 5. P. 448–453.
- Lorence R.M., Katubig B.B., Reichard K.W., Reyes H.M., Phuangsab A., Sasseti M.D., Walter R.J., Peeples M.E. // Cancer Res. 1994. V. 54. № 23. P. 6017–6021.
- Yurchenko K.S., Zhou P., Kovner A.V., Zavjalov E.L., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M. // PLoS One. 2018. V. 13. № 4. P. e0195425.
- Moore A.E. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1952. V. 54. № 6. P. 945–952.
- Ahamed T., Hossain K.M., Billah M.M., Islam K.M.D., Ahasan M.M., Islam M.E. // Int. J. Poult. Sci. 2004. V. 3. № 2. P. 153–156.
- Visnuvinayagam S., Thangavel K., Lalitha N., Malmarugan S., Sukumar K. // Braz. J. Microbiol. 2015. V. 46. № 3. P. 861–865.
- Kumar R., Tiwari A.K., Chaturvedi U., Kumar G.R., Sahoo A.P., Rajmani R.S., Saxena L., Saxena S., Tiwari S., Kumar S. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 167. № 7. P. 2005–2022.
- Flanagan A.D., Love R., Tesar W. // Proc. Soc. Exper. Bid. Med. 1955. V. 90. № 1. P. 82–86.
- Cassel W.A., Garrett R.E. // Cancer. 1965. V. 18. P. 863–868.
- Cassel W.A., Murray D.R., Torbin A.H., Olkowski Z.L., Moore M.E. // Cancer. 1977. V. 40. № 2. P. 672–679.
- Yurchenko K.S., Sivay M.V., Glushchenko A.V., Alkhovskiy S.V., Shchetinin A.M., Shchelkanov M.Y., Shestopalov A.M. // Genome Announ. 2015. V. 3. № 1. P. e01514-14.
- Kabilov M.R., Alikina T.Y., Yurchenko K.S., Glushchenko A.V., Gunbin K.V., Shestopalov A.M., Gubanova N.V. // Genome Announ. 2016. V. 4. № 6. pii: e01348-16.
- World Health Organization. Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf;jsessionid=E809BBF6E7FAD9118D7247FB101FF77E?sequence=1.
- World Health Organization. Virus titration and determination of tissue culture infectious dose (TCID50) for microneutralization assay. 2013. http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_serological_diagnosis_microneutralization_a_h7n9.pdf.
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз, Ленинградское отделение, 1962. 180 с.