

Оригинальная статья / Original article

УДК 578

DOI: 10.18470/1992-1098-2024-3-4



Противоопухолевый эффект штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/777/2010 на модели солидной карциномы Льюиса

Юрий И. Каркавин¹, Любовь С. Адаменко^{1,2}, Ксения С. Юрченко^{1,2}, Александра В. Глущенко^{1,2}¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ), Новосибирск, Россия²ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН), Новосибирск, Россия

Контактное лицо

Юрий И. Каркавин, младший научный сотрудник, лаборатория экспериментальной онкологии и испытания фармацевтических средств, НИИ Вирусологии, Федеральный Исследовательский Центр Фундаментальной и Трансляционной Медицины (ФИЦ ФТМ); 630060 Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова 2. Тел. +79538075349

Email karkaviny@mail.ruORCID <https://orcid.org/0000-0001-8320-6298>

Формат цитирования

Каркавин Ю.И., Адаменко Л.С., Юрченко К.С., Глущенко А.В. Противоопухолевый эффект штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/777/2010 на модели солидной карциномы Льюиса // Юг России: экология, развитие. 2024. Т.19, N 3. С. 44-54. DOI: 10.18470/1992-1098-2024-3-4

Получена 11 марта 2024 г.

Прошла рецензирование 10 июня 2024 г.

Принята 25 июня 2024 г.

Резюме

Цель: оценить эффективность интратуморальных введений штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/777/2010, сравнить прогрессирование опухолевых узлов после виротерапии, проанализировать патоморфологические изменения в опухолевой ткани *in vitro* и *in vivo*.

Проводили однократные интратуморальные инъекции мезогенным штаммом вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/777/2010, выделенным от сизого голубя на территории Сибири, аутбредным мышам линии C57Bl/6 в солидные узлы карциномы легких Льюиса, привитые подкожно. Затем оценивали динамику роста опухоли и проводили анализ патоморфологических изменений в опухолевой ткани.

Было показано, что однократные интратуморальные инъекции иммунокомпетентным мышам линии C57Bl/6 мезогенным штаммом вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/777/2010 привели к усилению характерных патоморфологических изменений в опухолевой ткани привитой подкожно карциномы легких Льюиса и к снижению роста опухоли по сравнению с контрольной группой мышей *in vivo*. Было отмечено прямое цитотоксическое действие штамма ВБН на клеточную линию Vero E6 *in vitro*.

Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что штамм ВБН NDV/Altai/pigeon/777/2010 обладает противоопухолевыми свойствами, что, возможно, позволит использовать его в клинических условиях в качестве эффективного противоопухолевого препарата.

Ключевые слова

Вирус болезни Ньюкасла, виротерапия, карцинома легких Льюиса, онколитические вирусы, опухолевая прогрессия.

Antitumor effect of the Newcastle disease virus strain NDV/Altai/pigeon/777/2010 on a model of solid Lewis carcinoma

Yuriy I. Karkavin¹, Lyubov S. Adamenko^{1,2}, Kseniya S. Yurchenko^{1,2} and Alexandra V. Glushchenko^{1,2}

¹Federal Research Centre of Fundamental and Translational Medicine (FRC FTM), Novosibirsk, Russia

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS), Novosibirsk, Russia

Principal contact

Yuriy I. Karkavin, junior researcher, Laboratory of Experimental Oncology and Pharmaceutical Testing, Research Institute of Virology, Federal Research Centre of Fundamental and Translational Medicine (FRC FTM); 2 Timakova St, Novosibirsk, Russia 630060.

Tel. +79538075349

Email karkaviny@mail.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8320-6298>

How to cite this article

Karkavin Yu.I., Adamenko L.S., Yurchenko K.S., Glushchenko A.V. Antitumor effect of the Newcastle disease virus strain NDV/Altai/pigeon/777/2010 on a model of solid Lewis carcinoma. *South of Russia: ecology, development*. 2024; 19(3):44-54. (In Russ.)
DOI: 10.18470/1992-1098-2024-3-4

Received 11 March 2024

Revised 10 June 2024

Accepted 25 June 2024

Abstract

Aim. To evaluate the efficacy of intratumoral administrations of the Newcastle disease virus strain NDV/Altai/pigeon/777/2010, to compare progression of the tumor nodes after virotherapy and to analyse pathomorphological changes in the tumor tissue *in vitro* and *in vivo*.

Single intratumoral injections of the mesogenic strain of Newcastle disease virus NDV/Altai/pigeon/777/2010, isolated from a rock dove in Siberia, were done into outbred mice of the C57Bl/6 line into solid nodes of Lewis lung carcinoma that were grafted subcutaneously. Then the dynamics of tumor growth and pathomorphological changes in the tumor tissue were assessed and analyzed.

It was shown that single intratumoral injections into immunocompetent C57Bl/6 mice with the mesogenic strain of Newcastle disease virus NDV/Altai/pigeon/777/2010 led to an increase in peculiar pathomorphological changes in the tumor tissue of subcutaneously grafted Lewis lung carcinoma and to a decrease in tumor growth compared to the control group of mice *in vivo*. A direct cytotoxic effect of the NDV strain on the Vero E6 cell line *in vitro* was noted.

The results of this study indicate that the NDV strain NDV/Altai/pigeon/777/2010 has antitumor properties. This may enable clinical trials to prove its effectiveness as an antitumor drug.

Key Words

Newcastle disease virus, virotherapy, Lewis lung carcinoma, oncolytic viruses, tumor progression.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, онкологические заболевания занимают второе место по причинам гибели людей после сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Поэтому поиск и разработка новых препаратов и подходов онкотерапии, основанных на внедрении новейших технологий и достижений клинической онкологии, остается актуальным направлением в области биологии и экспериментальной медицины.

В настоящее время основными методами лечения злокачественных и доброкачественных новообразований по-прежнему являются резекция опухоли, химиотерапия и лучевая терапия, которые иногда не в состоянии улучшить клинический исход болезни, часто оказывают высокотоксическое воздействие на местные ткани и не могут замедлить процессы инвазивного роста и метастазирования [2].

Вектор развития современной онкологии направлен на максимально индивидуализированные подходы к лечению пациентов со злокачественными образованиями из-за высокой степени гетерогенности онкологических заболеваний. Внедряются новые методы, нацеленные на активацию иммунных реакций в организме для борьбы с онкологическими заболеваниями (например, блокада иммунных контрольных точек [3], персонализированные вакцины [4] и Т-клетки с химерными антигенными рецепторами [5]). Эти исследования нацелены на выявление динамических изменений в биологических аномалиях опухоли, на устранение опухолевых клеток и уничтожение их субклонов, которые опосредуют резистентность к лечению [6].

Среди многочисленных методов и противораковых препаратов, которые были внедрены в клиническую онкологию в последнее время, выделяются таргетные препараты, в основе действия которых лежат принципы целевого воздействия на известные молекулярные процессы, происходящие в опухолевой ткани. Есть особая группа препаратов, которые служат в качестве вектора для доставки биологических, химических и радиоактивных онколитических агентов непосредственно в ткани опухоли [7]. Виротерапия представляет собой особый вид таргетной терапии, где в качестве противоопухолевых терапевтических агентов используются онколитические вирусы, которые способны избирательно инфицировать и уничтожать клетки злокачественных опухолей без повреждения клеток нормальных здоровых тканей [8]. Одним из перспективных для виротерапевтических разработок онколитических агентов является вирус болезни Ньюкасла (ВБН), принадлежащий к роду *Orthoavulavirus*, подсемейству *Avulovirinae* семейства *Paramyxoviridae* [9]. Его цитотоксическое действие на культуры опухолевых клеток и безопасность для нормальных клеток демонстрируют эффективность ВБН как онколитического агента.

В данном исследовании изучался противоопухолевый эффект природного штамма вируса болезни Ньюкасла (NDV/Altai/pigeon/777/2010) [10]. В качестве экспериментальной модели для исследования была выбрана опухолевая линия карциномы Льюиса (КЛЛ). Был продемонстрирован цитотоксический потенциал вируса на клетках КЛЛ *in vitro* и

статистически значимое снижение жизнеспособности клеток после инфицирования. В эксперименте *in vivo* изучено влияние внутриопухолевой инъекции вируса болезни Ньюкасла на процессы опухолевой прогрессии солидной подкожной карциномы Льюиса с оценкой динамики роста опухолевых подкожных узлов и исследованием изменения показателей уровней деструктивных изменений в опухолевой ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Суспензию клеток карциномы легкого Льюиса вводили аутбредным мышам-самцам линии C57Bl/6 подкожно в правый бок. Животных содержали в стандартных условиях. Штамм ВБН NDV/Altai/pigeon/777/2010 вводили интратуморально в течение 4 дней со следующего дня после пальпации опухолевого узла. Мышей из контрольной группы оставили интактными после введения опухолевых клеток. Измеряли влияние однократной интратуморальной инъекции на рост опухоли при помощи штангенциркуля [6]. Образцы опухолевой ткани получали на 2, 4, 6, 8, 10 и 14 сутки после интратуморального введения вируса. Морфологические изменения в опухолевой ткани оценивали с помощью рутинного окрашивания гематоксилином и эозином. Патоморфологические показатели (число митозов, объемная плотность некрозов) сравнивали с помощью морфометрического анализа срезов опухолевой ткани мышей из контрольной и экспериментальной групп [7]. Цитотоксический эффект штамма ВБН NDV/Altai/pigeon/777/2010 оценивали путем десятикратных разведений стокового образца ВБН на опухолевой клеточной линии Vero E6 по стандартной методике [8], затем считали 50%-ную тканевую цитотоксическую дозу (ТЦД₅₀) по методу Риды-Менча [9]. Жизнеспособность клеточной культуры после заражения штаммом ВБН определяли при помощи МТТ-теста [10].

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка жизнеспособности клеток карциномы легкого Льюиса после заражения штаммом NDV/Altai/pigeon/777/2010 при различной множественности инфицирования in vitro

Природный штамм NDV/Altai/pigeon/777/2010, нарабатанный на РКЭ, демонстрирует, что через одни сутки после заражения выживаемость мышинной клеточной культуры карциномы Льюиса составляет около 100% при низких дозах заражения – множественности инфицирования 0.01 и 0.1 MOI. Одновременно с этим уже на первые сутки после заражения при увеличении множественности инфицирования до 1 и 10 MOI отмечено снижение жизнеспособности клеток карциномы Льюиса до 62.28 и 37.36 %, соответственно. Однако, с течением нескольких суток в динамике наблюдения картина меняется, и выживаемость опухолевых клеточных линий при инфицировании в низких дозах (0.01 и 0.1 MOI) начинает снижаться, достигая 66.17 и 61.77 % к шестым суткам наблюдения, соответственно. По прошествии шести суток онколитический потенциал штамма ВБН в высоких дозах инфицирования (1 и 10 MOI) также снижается, но снижение жизнеспособности составляет примерно 20 и 15 %

между первыми сутками и шестыми сутками эксперимента, соответственно (рис. 1).

Природный штамм NDV/Altai/pigeon/777/2010, нарабатанный на клеточной культуре Vero E6, демультиплицирует высокую выживаемость мышшиной клеточной культуры карциномы Льюиса при разных дозах инфицирования вирусом относительно выживаемости клеток после инфицирования аллантаическим вариантом вируса. Вплоть до шестых суток после заражения выживаемость составляет 70–80 % (рис. 2). Заражение неразведенным культуральным вирусом (сток) приводит к снижению жизнеспособности клеток карциномы Льюиса до 47.98 ± 5.92 %, что приблизительно соответствует уровню

жизнеспособности клеток при инфицировании аллантаическим вариантом вируса 1 и 10 MOI к 4 суткам.

Исходя из представленных результатов оценки жизнеспособности клеток, штамм NDV/Altai/pigeon/777/2010, нарабатанный в аллантаической полости РКЭ, эффективно снижает жизнеспособность клеток опухолевой мышшиной линии карциномы Льюиса. По полученным результатам прослеживается дозозависимый эффект, который более выражен при высоких дозах инфицирования (1 и 10 MOI). Причем онколитический потенциал реализуется уже на первые сутки после инфицирования.

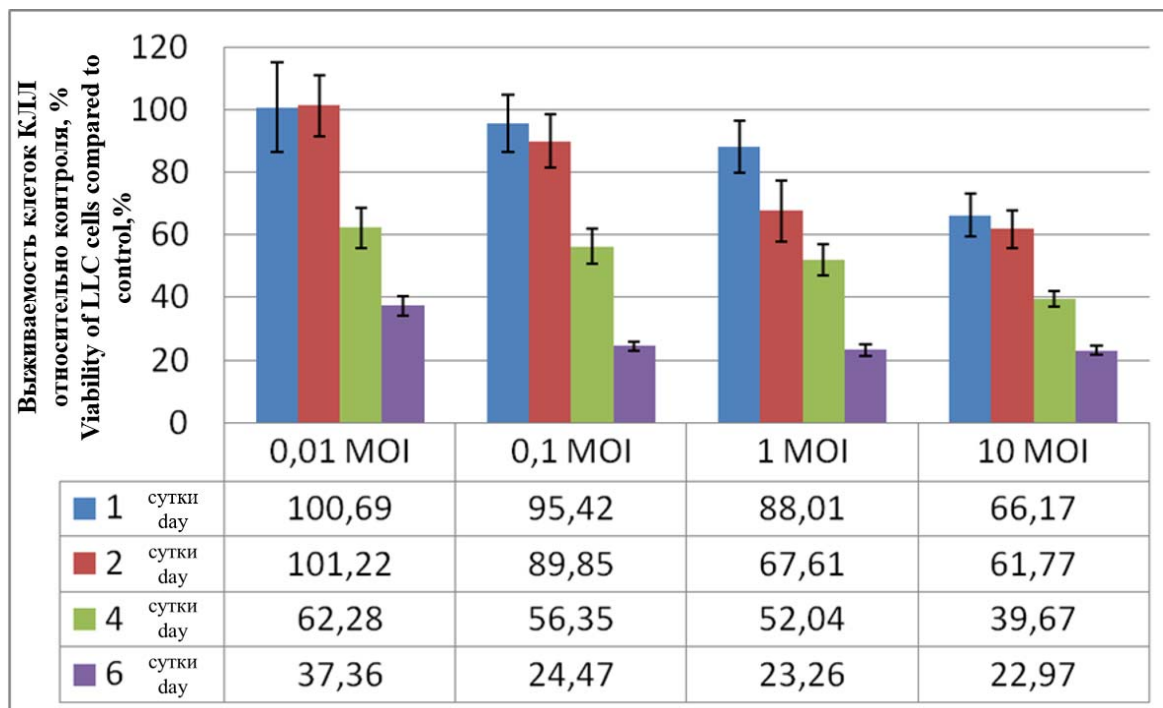


Рисунок 1. Онколитический эффект штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/777/2010, нарабатанного на РКЭ, с инфекционным титром 7.00 ± 0.38 IgTC₅₀/мл, на перевиваемой опухолевой линии клеток мышшиной карциномы Льюиса *in vitro*, MTT-тест, 540 нм. MOI – множественность инфицирования

Figure 1. Oncolytic effect of the Newcastle disease virus strain NDV/Altai/pigeon/777/2010, developed on DCE, with an infectious titer of 7.00 ± 0.38 IgTC₅₀/ml, on a continuous tumor cell line of Lewis lung carcinoma *in vitro*, MTT test, 540 nm. MOI is the multiplicity of infection

2. Динамика роста опухолевого узла карциномы Льюиса и влияние интратуморальной инъекции NDV/Altai/pigeon/777/2010 на продолжительность жизни мышей с опухолью

У контрольной группы мышей-опухолосителей происходило увеличение размеров подкожных солидных узлов карциномы Льюиса. Размеры узла карциномы Льюиса также поступательно увеличивались, несмотря на интратуморальную виротерапию. Однако однократные интратуморальные инъекции штаммом ВБН NDV/Altai/pigeon/ 777/2010 приводили к значительному снижению объема опухолевых узлов по сравнению с мышшами контрольной группы (рис. 3).

Таким образом, сравнивая с динамикой нарастания объема опухоли у контрольных животных, показано, что однократная интратуморальная инъекция вирусом NDV/Altai/pigeon/ 777/2010 оказывает сдерживающий опухолевый рост эффект на карциному Льюиса.

У всех животных с перевитой опухолью узел сформировался и начал пальпироваться через 19–22 суток. На протяжении всего эксперимента не было случаев гибели животных после трансплантации опухолевых клеток. Животных выводили из эксперимента при достижении объема опухолевого узла 2000–2500 мм³. На основании порогового объема опухолевого узла в контрольной группе (без лечения) животные были выведены из эксперимента к 16–18 суткам после виротерапии.

Животных, получивших однократную интратуморальную инъекцию исследуемым штаммом ВБН, которых оставили для доживания, вывели из эксперимента с забором материала к 26-м суткам после виротерапии. Максимальный размер опухолевого узла составлял 2599.63 ± 201.60 мм³ в контрольной группе животных и 2252.14 ± 250.10 мм³ в группе животных, получавших инъекцию вируса.

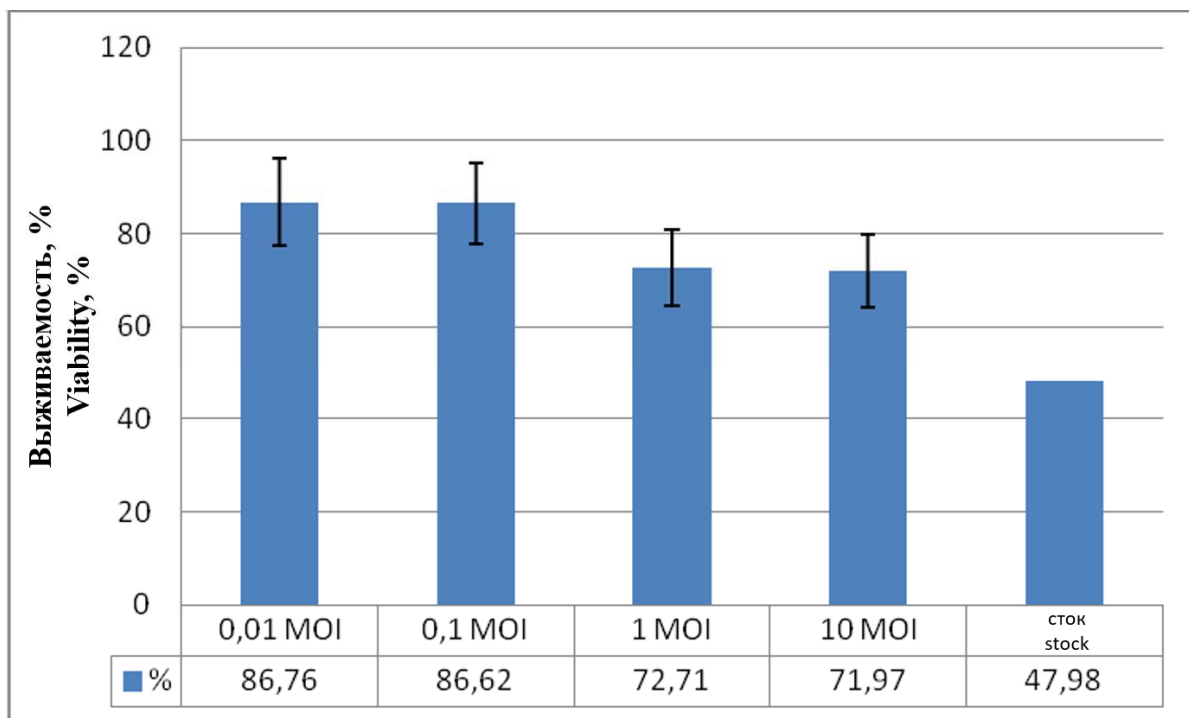


Рисунок 2. Онколитический эффект штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/777/2010, наработанного на клеточной культуре Vero, с инфекционным титром $7.00 \pm 0.25 \text{ IgTC}_{50}/\text{мл}$, на перевиваемой опухолевой линии клеток мышиной карциномы Льюиса *in vitro*, MTT-тест, 540 нм. 6 сутки после инфицирования.

MOI – множественность инфицирования, сток – не разведенный культуральный вирус

Figure 2. Oncolytic effect of the Newcastle disease virus strain NDV/Altai/pigeon/777/2010, developed on Vero cell culture, with an infectious titer of $7.00 \pm 0.25 \text{ IgTC}_{50}/\text{ml}$, on a continuous tumor cell line of Lewis lung carcinoma *in vitro*, MTT test, 540 nm. 6 days after infection. MOI = multiplicity of infection. The stock was undiluted cultural virus.

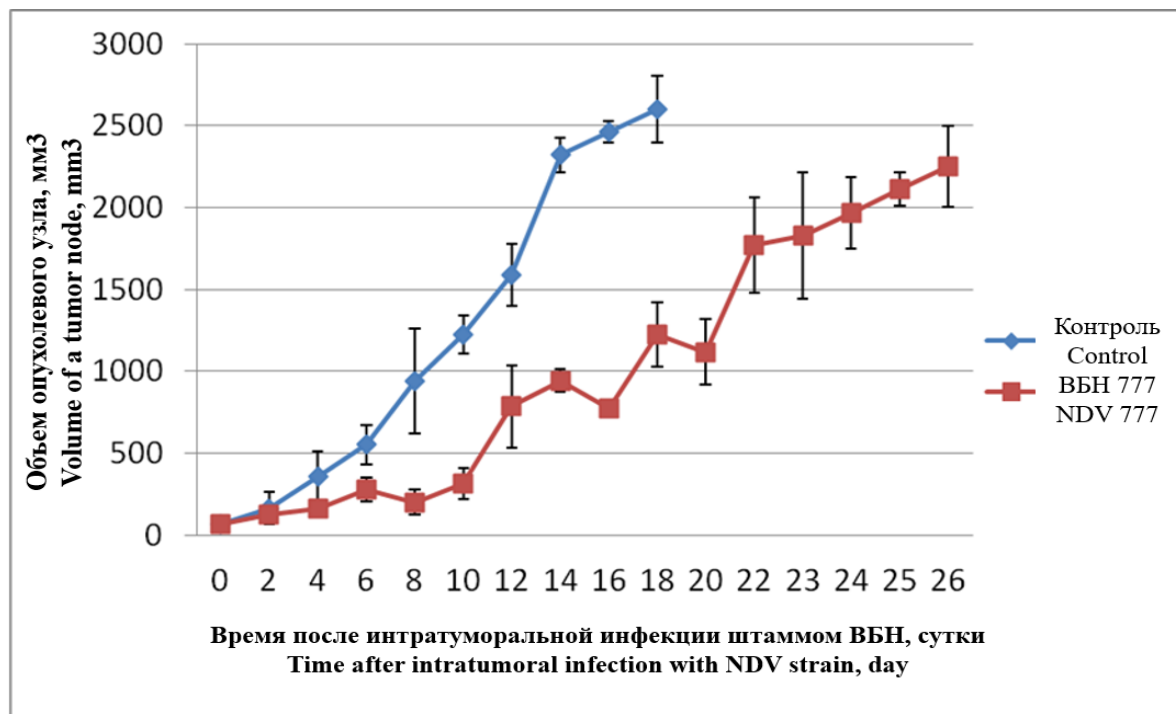


Рисунок 3. Изменение объема опухолевых узлов карциномы Льюиса, привитых мышам C57Bl/6, у животных без лечения (контроль) и у животных, получавших однократную интратуморальную инъекцию вируса болезни Ньюкасла (ВБН 777) NDV/Altai/pigeon/777/2010, наработанного в аллантоической жидкости РКЭ

Figure 3. Changes in the volume of Lewis lung carcinoma tumor nodes inoculated with C57Bl/6 mice in untreated animals (control) and in animals receiving a single intratumoral injection of the Newcastle disease virus (NDV 777) NDV/Altai/pigeon/777/2010, accumulated in the allantoic fluid of the DCE

3. Морфологические особенности ткани опухоли в динамике наблюдения после однократной интратуморальной инъекции вирусом ВБН NDV/Altai/pigeon/777/2010

Как показано на рисунке 4, обнаружили взаимосвязь между интратуморальным введением ВБН и количеством митотических клеток. С первых точек наблюдения после окончания виротерапии ВБН отмечено, что количество митозов в опухолевой ткани карциномы Льюиса значительно снижено по сравнению с контрольной группой животных на всех точках наблюдения. Кроме того, среднее количество митозов в

контрольной группе, не получавшей инъекции вируса, существенно не изменилось (оно составило 7.76 на 1-й день и 7.68 на 10-й день после виротерапии), в то время как в экспериментальной группе, получавшей однократную интратуморальную инъекцию ВБН, значение параметра было уже в первый день ниже по сравнению с контролем (в 3.00 раза на 2 сутки и в 1.6 раза на 10 сутки после инъекции ($p \leq 0.05$)). Показатель среднего количества митозов при этом увеличился в экспериментальной группе (в 1.85 раз со 2 по 10 сутки после инъекции ВБН ($p \leq 0.05$)).

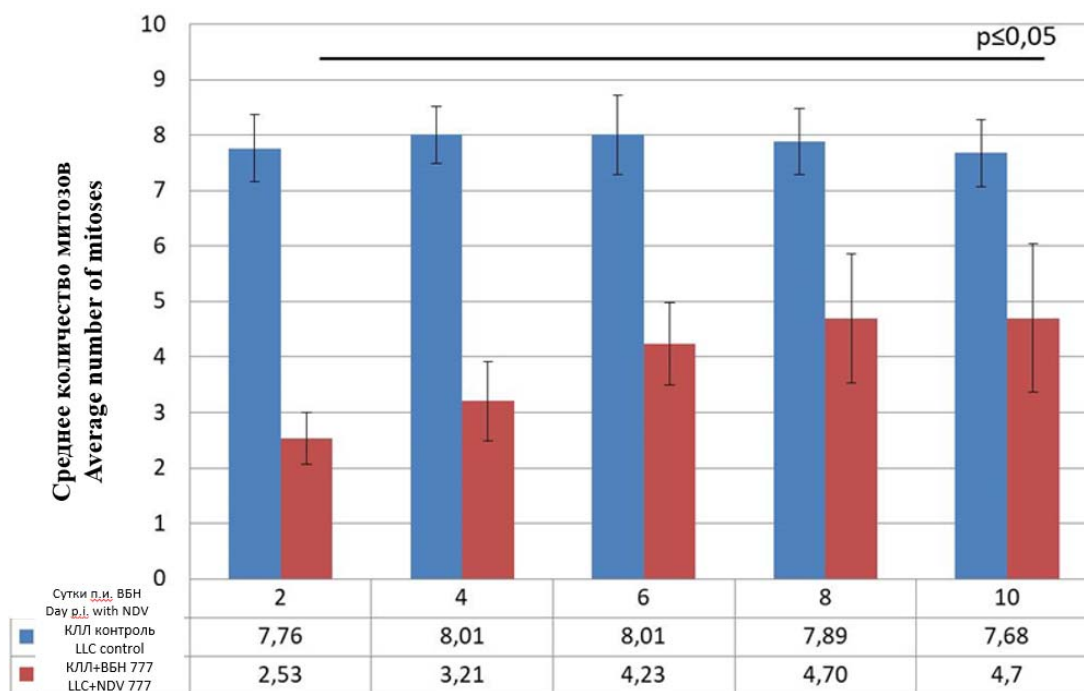


Рисунок 4. Количество митотических фигур в опухолевой ткани карциномы Льюиса мышей линии C57Bl/6 после интратуморальной инъекции (КЛЛ+ВБН 777); подсчет митотических фигур проводили с увеличением $\times 40$. Статистически значимая разница между мышами, получавшими вирусную инъекцию и контрольной группой, а также между 2 и 10 сутками наблюдения после инъекции ВБН в экспериментальной группе мышей $p \leq 0.05$ были рассчитаны с помощью t-критерия

Figure 4. The number of mitotic figures in the tumor tissue of Lewis lung carcinoma in C57Bl/6 mice after intratumoral injection (LLC+NDV 777) (the count of mitotic figures being carried out under $\times 40$ magnification. The statistically significant differences between the mice receiving viral injection and the control group, as well as between 2 and 10 days of follow-up after injection with NDV in the experimental group of mice $p \leq 0.05$ were calculated using the t-test

Гибель клеток карциномы Льюиса путем некроза и апоптоза была отмечена в опухолевой ткани в группе мышей с интратуморальной инъекцией штамма ВБН, так и в контрольной группе без лечения. Наличие очагов некроза и кровоизлияния в опухолевой ткани могло иметь ишемическую природу, поскольку опухолевые узлы активно росли, что отражено в графике динамики изменения объема опухолевого узла (рис. 3) и, вероятно, опережали рост сосудов, которые необходимы для питания опухоли. Морфометрический анализ деструктивных участков показал некротические изменения в обеих группах (рис. 5).

Деструктивные изменения в опухолевой ткани были зафиксированы на вторые сутки после виротерапии, а также в контрольной группе. В контрольной группе с трансплантированной опухолью и без лечения объемная плотность некроза составила 30.96 ± 3.19 %. Далее объемная плотность некроза незначительно увеличилась без достоверных отличий и

достигла 36.95 ± 8.06 % на 6 сутки после инъекции. Рост объемной плотности некрозов отмечен к 8 суткам и 10 суткам после инъекции – 51.13 ± 3.96 % и 59.15 ± 5.18 %, соответственно. Рост патоморфологических изменений в опухолевой ткани в контрольной группе на 8 и 10 сутки возможно связан с быстрым опухолевым ростом узлов на данных точках наблюдения.

Интратуморальная инъекция вируса индуцировала рост некротических процессов, которые занимали примерно 48.93 ± 3.80 % ткани опухоли уже на вторые сутки после виротерапии, и этот показатель существенно не изменялся вплоть до 8 суток наблюдения. Таким образом, наблюдали нарастание объемной плотности некрозов опухоли карциномы Льюиса в экспериментальной группе к 10 суткам, но в группе контроля без лечения штаммом ВБН увеличение этого показателя было достоверно ниже и менее выражено.

На многих препаратах опухолевых узлов отмечена особенность – опухолевые клетки, тесно переплетаясь с

адипоцитами в основном в периферических областях узлов, придают опухолевой ткани ячеистый вид (рис. 6).

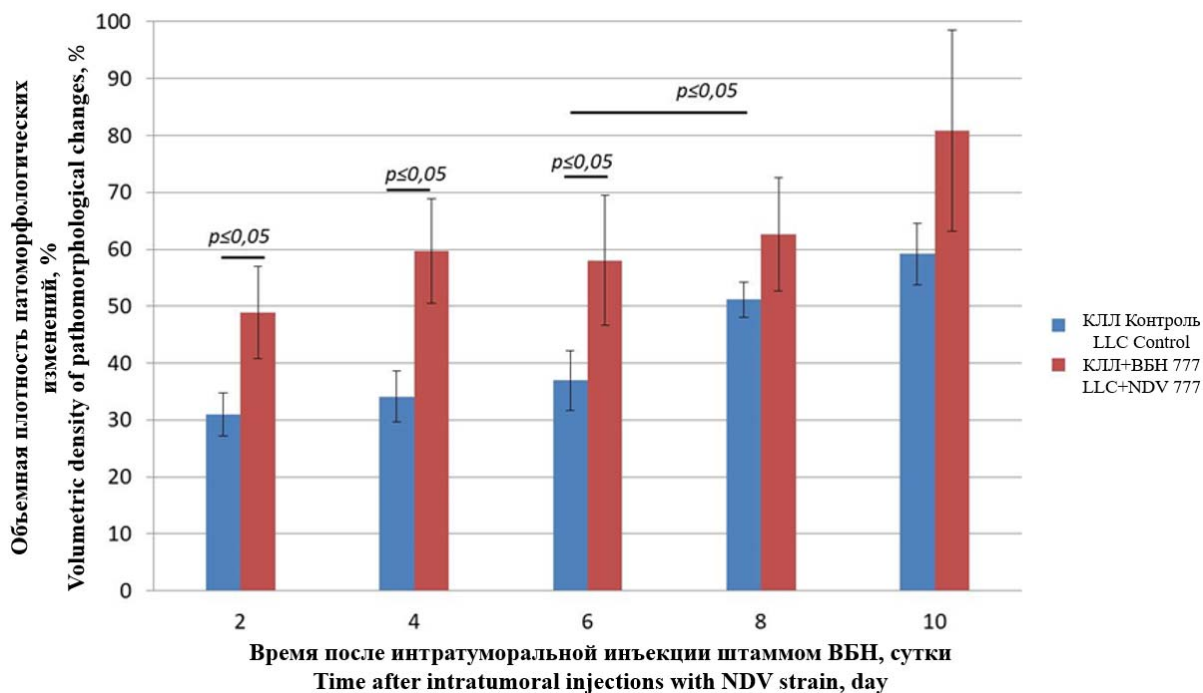


Рисунок 5. Количественный анализ некротических участков в опухолевой ткани карциномы Льюиса

Оценка деструктивных изменений в подкожных опухолевых узлах у мышей, не получавших ВБН, и у мышей с интратуморальной инъекцией вируса. КЛЛ контроль – контрольная группа без лечения; КЛЛ + ВБН 777 – группа с интратуморальной однократной инъекцией ВБН. Результаты представлены в виде относительных средних значений \pm стандартное отклонение. $p \leq 0.05$ были рассчитаны с помощью t-критерия

Figure 5. Quantitative analysis of necrotic sites in the tumor tissue of Lewis lung carcinoma

Assessment of destructive changes in subcutaneous tumor nodes in the mice that did not receive NDV and in the mice with intratumoral injection of the virus. LLC control was a control group without treatment; LLC + NDV 777 is a group with intratumoral single injection with NDV. The results that presented as relative averages \pm standard deviation ($p \leq 0.05$) were calculated using the t-test

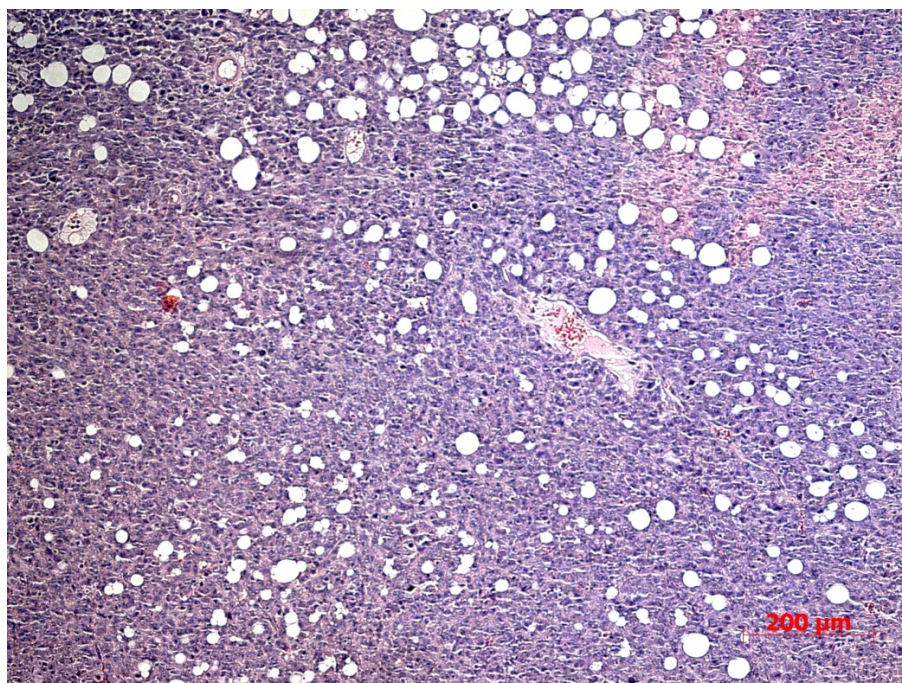


Рисунок 6. Инфильтрация подкожно-жировой клетчатки, очагами в виде сот, в опухолевые узлы карциномы Льюиса, получавшей однократную интратуморальную инъекцию штамма вируса болезни Ньюкасла NDV/Altai/pigeon/777/2010. 14-е сутки после виротерапии, окраска гематоксилином-эозином. Увеличение $\times 10$

Figure 6. Infiltration of subcutaneous fat - foci in the form of honeycombs - into the tumor nodes of Lewis lung carcinoma that received a single intratumoral injection of the Newcastle disease virus strain NDV/Altai/pigeon/777/2010. 14th day after virotherapy – stained with hematoxylin-eosin. $\times 10$ magnification

Возникновение и развитие опухоли во многих аспектах зависят от ее микроокружения (ТМЕ). Метаболическая трансформация является не только признаком рака, но и ключевой целью лечения рака. Из-за влияния раковых клеток на физиологические характеристики ТМЕ, большой интерес вызывает ремоделирование ТМЕ в качестве потенциальной стратегии лечения раковых заболеваний. По всей видимости, адипоциты (клетки, обильно инфильтрирующие ТМЕ) играют ключевую роль в опухолевой прогрессии. Адипоциты считаются важными компонентами ТМЕ, могут мигрировать из ТМЕ непосредственно в опухоль и обратно [11]. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что адипоциты, совместно культивируемые с раковыми клетками, подвергались значительным морфологическим и функциональным изменениям: снижалось содержание липидов и маркеров адипоцитов, таких как адипонектин, лептин и белок, связывающий жирные кислоты (FABP)2 [12–14]. Сверхэкспрессия интерлейкина (IL)-6, IL-1 и матриксной металлопротеиназы (MMP)-11 также наблюдали у таких адипоцитов, которые впоследствии стали называть опухоль-ассоциированными адипоцитами (САА). Примечательно, что в опухолевой ткани рост и метастазирование ускоряются в присутствии адипоцитов, например, при раке молочной железы или в анатомических участках, где раковые клетки расположены близко к жировой ткани, в том числе при раке желудка, толстой кишки и яичников [15]. Адипоциты участвуют в очень сложном воспалительном цикле, который регулируется опухолевыми клетками, способствуя развитию опухоли. САА также вызывают лекарственную устойчивость при лечении онкологиче-

ских заболеваний, например, при химиотерапии, радиотерапии, гормональной терапии и иммунотерапии, что может привести к персистенции опухолевых клеток и увеличить риск рецидива опухоли [14]. Помимо всего этого, рост опухолей приводит к усиленной мобилизации липидов жировых депо и, часто по мере прогрессии опухоли возникает гиперлипидемия раковых клеток. Часть липидов ассимилируется опухолью для образования мембран пролиферирующими опухолевыми клетками. В основном, мобилизацию адипоцитов опухолевыми клетками считают проявлением компенсаторной реакции на гипогликемическое влияние опухоли, позволяющую тканям при недостатке глюкозы использовать окисление жирных кислот в качестве дополнительного источника энергии. К тому же адипоциты, вероятно, выполняют каркасную функцию, поддерживая структуру опухоли.

Исходя из данных рисунка 7, заметно снижение количества адипоцитов в толще опухолевой ткани по мере роста опухоли, как в контрольной, так и при однократной инъекции вирусом. На 2-е сутки в группе мышей, подвергшихся виротерапии, количество адипоцитов в поле зрения больше, чем в 2 раза по сравнению с контролем (179 и 73 соответственно). Однако на 4-е сутки картина меняется: в контрольных образцах количество адипоцитов преобладало почти в 2 раза (52 и 101). С 6 по 10 сутки количество адипоцитов резко сокращается в обеих группах, причем в контрольных образцах их кратно меньше, чем при виротерапии (34-5, 23-5, 13-8 на 6, 8 и 10 сутки соответственно). На 14-е сутки количество адипоцитов увеличивается в обеих группах (73 и 21).

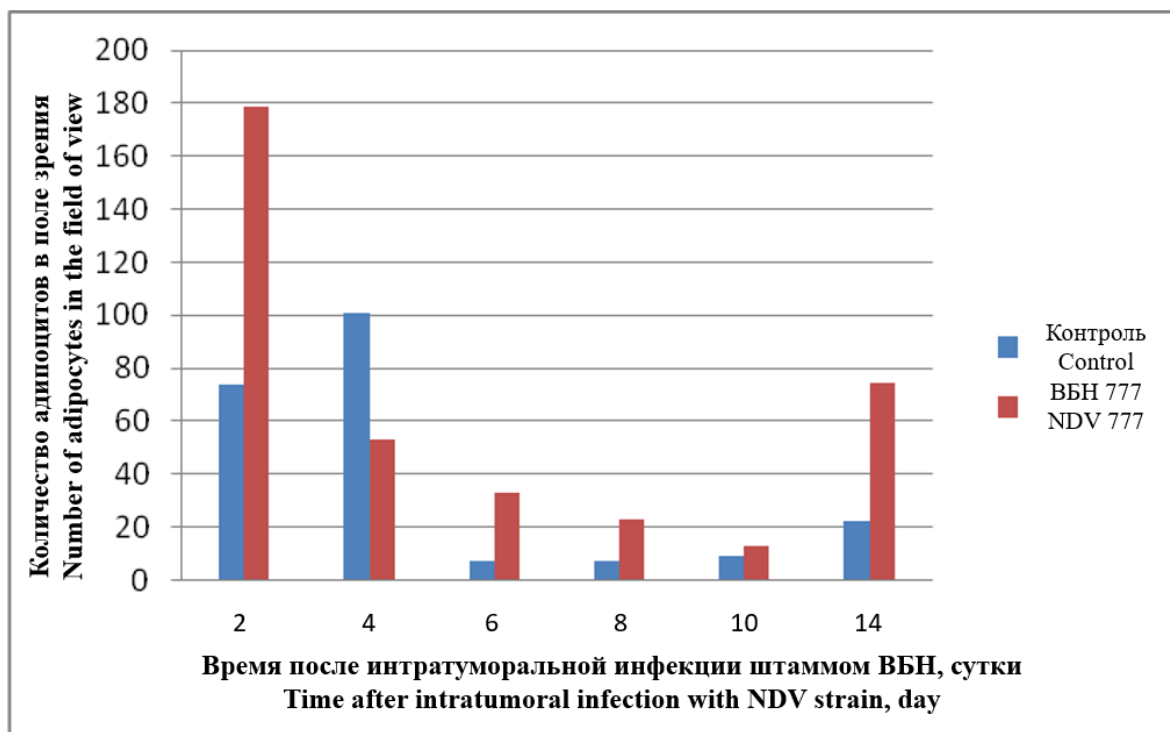


Рисунок 7. Количество инфильтратов подкожно-жировой клетчатки в опухолевой ткани карциномы Льюиса мышей линии C57Bl/6 после интратуморальной инъекции (ВБН 777) и в контрольной группе (без лечения); подсчет фигур проводили с увеличением $\times 20$ в поле зрения с наибольшим количеством инфильтратов

Figure 7. The number of subcutaneous fat infiltrates in the tumor tissue of Lewis lung carcinoma in C57Bl/6 mice after an intratumoral injection (NDV 777) and in the control group (without treatment). Figures were counted $\times 20$ under magnification 20 in the field of view with the largest number of infiltrates

Судя по вышеприведённым данным, в целом наблюдается снижение количества адипоцитов в толще опухолевой ткани как в контрольной группе, так и при виротерапии, причем в группе леченных мышей их, в общем,кратно больше. Это могло произойти по двум причинам. Во-первых, подобный результат может быть связан с тем, что трофика опухолевой ткани при виротерапии нарушена сильнее, в связи с чем туда привлекается большее количество адипоцитов с их жировыми депо в качестве дополнительного источника энергии. Во-вторых, возможно, это также связано с увеличенной площадью некротических изменений в опухоли по сравнению с контролем, из-за чего происходит мобилизация адипоцитов из белой жировой ткани в место локализации опухоли для поддержания ее структуры. По мере роста объема опухолевого узла увеличивается площадь патоморфологических нарушений в опухолевой ткани, вследствие чего снижается количество адипоцитов, мигрирующих в опухоль, поскольку нарушается рост кровеносных сосудов, по которым клетки мигрируют. Вероятно, увеличение количества жировых клеток на 14-е сутки в обеих группах произошло из-за частичного восстановления структуры и трофики опухолевой ткани. Патоморфологических изменений в структуре этих клеток замечено не было (нормальные адипоциты белой жировой ткани, не трансформированные в опухоль-ассоциированные), что намекает на слабую степень взаимодействия между опухолевыми клетками и адипоцитами.

Таким образом, согласно анализу гистологических срезов опухолевых узлов карциномы Льюиса, деструктивные изменения в быстрорастущей опухоли связаны с некротической морфологией в экспериментальной и контрольной группах мышей. Увеличение объемной плотности некроза может быть частично связано с развитием ишемического некротического эффекта вследствие сдавления опухолевой ткани в солидном узле КЛЛ, как описано ранее в модели опухоли Кребса-2 [4]. Однако объемная плотность некроза в опухолевой ткани после внутривенной виротерапии ВБН была значительно выше, чем в опухолевой ткани необработанных животных (показано на рис. 5), при условии, что объем опухолевых узлов в контрольной группе был на 37.5–48.2 % больше во всех точках наблюдения (показано на рис. 3). Более того, известно, атипичные митозы и повышенный уровень митотической активности свойственны для злокачественных опухолей – повышенная митотическая активность может служить свидетельством неблагоприятного прогноза опухолевой прогрессии. В настоящей работе показано, что среднее количество митозов снижено в опухоли карциномы Льюиса после интратуморальной инъекции штаммом ВБН NDV/Altai/pigeon/777/2010 по сравнению с контрольной группой мышей во всех точках наблюдения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показывают, что однократные интратуморальные инъекции природным изолятом штамма ВБН NDV/Altai/pigeon/777/2010 мышам C57Bl/6 с подкожным введением КЛЛ оказывают сдерживающее действие на рост опухолевого узла. Этот штамм эффективно снижает жизнеспособность клеток КЛЛ *in vitro* в зависимости от дозы вируса, использованной при заражении.

Наблюдали объемную плотность некрозов в опухолях; в группе без лечения увеличение было менее выраженным. Количество митозов в ткани КЛЛ после интратуморального введения снижается по сравнению с контрольной группой мышей во всех точках наблюдения. Количество адипоцитов уменьшалось как в контрольной группе, так и в группе, леченной данным штаммом ВБН. Исследовательский проект является попыткой углубить понимание дополнительного механизма подавления роста опухоли при виротерапии с помощью ВБН, что приводит к прямому цитотоксическому воздействию на опухолевые клетки. Онколитическая виротерапия на основе штамма ВБН дикого типа может быть эффективной за счет использования как иммунологической активации, так и способности напрямую лизировать опухолевые клетки. Эти результаты позволяют предположить, что штамм природный изолят штамма ВБН обладает противоопухолевыми свойствами и может служить перспективным и эффективным противоопухолевым препаратом.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН № 122110700001-5 и при поддержке гранта РНФ № 24-24-00367.

ACKNOWLEDGMENT

The work was carried out within the framework of the state assignment of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences No. 122110700001-5 and was supported Russian Science Foundation grant № 24-,24-00367.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Brunner Th. The rationale of combined radiotherapy and chemotherapy - Joint action of Castor and Pollux // Best Practice and Research Clinical Gastroenterology. 2016. V. 30. N 4. P. 515–528. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.07.002>
2. Tang Ch., Li L., Mo T., Qian Zh., Fan D., Sun X., Yao M., Pan L., Huang Y., Zhong L. Oncolytic viral vectors in the era of diversified cancer therapy: from preclinical to clinical // Clinical and Translational Oncology. 2022. V. 24. N 9. P. 1682–1701. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-02830-x>
3. Wu Y.-Y., Sun T.-K., Chen M.-Sh., Munir M., Liu H.-J. Oncolytic viruses-modulated immunogenic cell death, apoptosis and autophagy linking to virotherapy and cancer immune response // Frontiers Cellular Infectional Microbiology. 2023. V. 13. N 1142172. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1142172>
4. Yurchenko K.S., Glushchenko A.V., Gulyaeva M.A., Bi Y., Chen J., Shi W., Adamenko L.S., Shestopalov A.M. Intratumoral virotherapy with wild-type Newcastle disease virus in carcinoma Krebs-2 cancer model // Viruses. 2021. V. 13. N 4. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/v13040552>
5. Kabilov M.R., Alikina T.Y., Yurchenko K.S., Glushchenko A.V., Gunbin K.V., Shestopalov A.M., Gubanov N.V. Complete genome sequences of two Newcastle disease virus strains isolated from a wild duck and a pigeon in Russia // Genome Announcement. 2016. V. 4. N 6. Article id: e01348-16. P. 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01348-16>
6. Baris M.M., Serinan E., Calisir M., Simsek K., Aktas S., Yilmaz O., Kilic Ozdemir S., Secil M. Xenograft Tumor Volume Measurement in Nude Mice: Estimation of 3D Ultrasound Volume Measurements Based on Manual Caliper Measurements // Journal of Basic and Clinical Health Sciences.

2020. V. 4. N 2. P. 90–95.

<https://doi.org/10.30621/jbachs.2020.902>

7. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия.

Руководство. Москва: Медицина, 1990. 384 с.

8. McGinnes L., Pantua H., Reitter J., Morrison T. Newcastle disease virus: propagation, quantification, and storage // *Current Protocols in Microbiology*. 2006. Ch. 15(15). F.2.1-15F.2.18.

<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15f02s01>

9. Lei C., Yang J., Hu J., Sun X. On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity // *Virologica Sinica*. 2021. V. 36. N 1. P. 141–144. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00230-5>

10. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018. V. 1. N 6. pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

11. Lazar I., Clement E., Attane C., Muller C., Nieto L. A new role for extracellular vesicles: How small vesicles can feed tumors' big appetite // *Journal of Lipid Research*. 2018. V. 59. N 10. P. 1793–1804. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083725>

12. Dirat B., Bochet L., Dabek M., Daviaud D., Dauvillier S., Majed B., Wang Y.Y., Meulle A., Salles B., Le Gonidec S. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion // *Cancer Research*. 2011. V. 71. N 7. P. 2455–2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>

13. Vaupel H., Schmidberger A., Mayer A. The Warburg effect: Essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression // *International Journal of Radiation Biology*. 2019. V. 95. N 7. P. 912–919. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589653>

14. Hoxhaj G., Manning B.D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism // *Nature Reviews Cancer*. 2020. V. 20. N 2. P. 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>

15. Nieman K.M., Romero I.L., Van Houten B., Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2013. V. 1831. N 10. P. 1533–1541. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.010>

REFERENCES

1. Brunner Th. The rationale of combined radiotherapy and chemotherapy - Joint action of Castor and Pollux. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 2016, vol. 30, no. 4, pp. 515–528. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.07.002>
2. Tang Ch., Li L., Mo T., Qian Zh., Fan D., Sun X., Yao M., Pan L., Huang Y., Zhong L. Oncolytic viral vectors in the era of diversified cancer therapy: from preclinical to clinical. *Clinical and Translational Oncology*, 2022, vol. 24, no. 9, pp. 1682–1701. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-02830-x>
3. Wu Y.-Y., Sun T.-K., Chen M.-Sh., Munir M., Liu H.-J. Oncolytic viruses-modulated immunogenic cell death, apoptosis and autophagy linking to virotherapy and cancer immune response. *Frontiers Cellular Infectational Microbiology*, 2023, vol. 13, no. 1142172. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1142172>

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Юрий И. Каркавин написал манускрипт. Ксения С. Юрченко разработала дизайн исследования. Юрий И. Каркавин, Любовь С. Адаменко, Ксения С. Юрченко и Александра В. Глушенко провели эксперимент. Юрий И. Каркавин и Ксения С. Юрченко обработали и интерпретировали результаты исследования. Александра В. Глушенко рецензировал и редактировал рукопись. Все авторы в равной степени несут

4. Yurchenko K.S., Glushchenko A.V., Gulyaeva M.A., Bi Y., Chen J., Shi W., Adamenko L.S., Shestopalov A.M. Intratumoral virotherapy with wild-type Newcastle disease virus in carcinoma Krebs-2 cancer model. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 4, pp. 1–16. <https://doi.org/10.3390/v13040552>

5. Kabilov M.R., Alikina T.Y., Yurchenko K.S., Glushchenko A.V., Gunbin K.V., Shestopalov A.M., Gubanova N.V. Complete genome sequences of two Newcastle disease virus strains isolated from a wild duck and a pigeon in Russia. *Genome Announcement*, 2016, vol. 4, no. 6, article id: e01348-16, pp. 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01348-16>

6. Baris M.M., Serinan E., Calisir M., Simsek K., Aktas S., Yilmaz O., Kilic Ozdemir S., Secil M. Xenograft Tumor Volume Measurement in Nude Mice: Estimation of 3D Ultrasound Volume Measurements Based on Manual Caliper Measurements. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 2020, vol. 4, no. 2, pp. 90–95. <https://doi.org/10.30621/jbachs.2020.902>

7. Автандилов Г.Г. *Медицинская морфометрия. Руководство* [Medical morphometry. Guidance]. Moscow, Meditsina Publ., 1990, 384 p. (In Russian)

8. McGinnes L., Pantua H., Reitter J., Morrison T. Newcastle disease virus: propagation, quantification, and storage. *Current Protocols in Microbiology*, 2006, ch.15(15), F.2.1-15F.2.18. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15f02s01>

9. Lei C., Yang J., Hu J., Sun X. On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity. *Virologica Sinica*, 2021, vol. 36, no. 1, pp. 141–144. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00230-5>

10. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, vol. 1, no. 6, pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

11. Lazar I., Clement E., Attane C., Muller C., Nieto L. A new role for extracellular vesicles: How small vesicles can feed tumors' big appetite. *Journal of Lipid Research*, 2018, vol. 59, no. 10, pp. 1793–1804. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083725>

12. Dirat B., Bochet L., Dabek M., Daviaud D., Dauvillier S., Majed B., Wang Y.Y., Meulle A., Salles B., Le Gonidec S. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research*, 2011, vol. 71, no. 7, pp. 2455–2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>

13. Vaupel H., Schmidberger A., Mayer A. The Warburg effect: Essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International Journal of Radiation Biology*, 2019, vol. 95, no. 7, pp. 912–919. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589653>

14. Hoxhaj G., Manning B.D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 2020, vol. 20, no. 2, pp. 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>

15. Nieman K.M., Romero I.L., Van Houten B., Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, vol. 1831, no. 10, pp. 1533–1541. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.010>

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Yuriy I. Karkavin wrote the manuscript. Kseniya S. Yurchenko designed the study. Yuriy I. Karkavin, Lyubov S. Adamenko, Kseniya S. Yurchenko and Alexandra V. Glushchenko conducted the experiment. Yuriy I. Karkavin and Kseniya S. Yurchenko processed and interpreted the results of the study. Alexandra V. Glushchenko reviewed and edited the manuscript. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

ответственность при обнаружении плагиата,
самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Юрий И. Каркавин / Yuriy I. Karkavin <https://orcid.org/0000-0001-8320-6298>

Любовь С. Адаменко / Lyubov S. Adamenko <https://orcid.org/0000-0001-3622>

Ксения С. Юрченко / Kseniya S. Yurchenko <https://orcid.org/0000-0002-0679-8493>

Александра В. Глущенко / Alexandra V. Glushchenko <https://orcid.org/0000-0002-5784-0073>