



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-204>

© НАЗАРЕНКО А.С., БИРЮКОВА Ю.К., ОРЛОВА Е.А., ТРАЧУК К.Н., ИВАНОВА А.Л., БЕЛЯКОВА А.В., ПЕСТОВ Н.Б., ВОРОВИЧ М.Ф., ИШМУХАМЕТОВ А.А., КОЛЯСНИКОВА Н.М., 2023

Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов желтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластом и карцином поджелудочной железы

Назаренко А.С.¹, Бирюкова Ю.К.¹✉, Орлова Е.А.¹, Трачук К.Н.¹, Иванова А.Л.¹,
Белякова А.В.¹, Пестов Н.Б.¹, Ворovich М.Ф.^{1,2}, Ишмухаметов А.А.^{1,2}, Колясникова Н.М.¹¹ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), 108819, г. Москва, Россия;²Институт трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Флавивирусы имеют потенциал в терапии глиобластом при использовании безопасных для человека штаммов или в качестве системы доставки противоопухолевых агентов.**Цель.** Исследование чувствительности клеточных линий глиобластом и карцином поджелудочной железы к вакцинным штаммам вирусов желтой лихорадки (ВЖЛ) и клещевого энцефалита (ВКЭ).**Материалы и методы.** Исследовали клеточные линии глиобластомы GL-6, T98G, LN-229, карциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2 и протоковой карциномы поджелудочной железы человека PANC-1. Использовали следующие вирусные штаммы: штамм 17D ВЖЛ, штамм Софьин ВКЭ. Количественное определение вирусов проводили методом бляшкообразования и полимеразной цепной реакции. Определение чувствительности клеток к вирусам выполняли с помощью МТТ-теста.**Результаты.** Показано, что штамм 17D ВЖЛ оказывал онколитическое действие на опухолевые клетки карциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2 и имел ограниченный эффект в отношении протоковой карциномы поджелудочной железы PANC-1. В отношении клеточных линий глиобластом (LN229, GL6, T98G) вирус не оказывал онколитического действия, концентрация вирусной РНК в культуральной среде снижалась. Штамм Софьин ВКЭ вызывал менее выраженное цитопатическое действие в культуре клеток MIA PaCa-2 и PANC-1 и не оказывал онколитического действия на клеточных линиях глиобластом (LN229, T98G и GL6), хотя репродукция вируса в этих культурах продолжалась. Для глиобластомы GL6 концентрация вирусной РНК в культуральной среде сохранялась на уровне 1×10^9 ГЭ/мл в течение 13 сут после заражения, а в случае LN229 концентрация вирусной РНК возрастала с 1×10^9 до 1×10^{10} ГЭ/мл.**Заключение.** Поведение опухоли в макроорганизме сложнее, чем *in vitro*, поэтому целесообразно продолжить изучение противоопухолевых онколитических и иммуномодулирующих эффектов штаммов 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на моделях *in vivo*.**Ключевые слова:** онколитические вирусы; флавивирусы; вирус желтой лихорадки; вирус клещевого энцефалита; культура клеток; глиобластома; карцинома поджелудочной железы; протоковая карцинома поджелудочной железы; чувствительность к вирусам; вирусный онколиз**Для цитирования:** Назаренко А.С., Бирюкова Ю.К., Орлова Е.А., Трачук К.Н., Иванова А.Л., Белякова А.В., Пестов Н.Б., Ворovich М.Ф., Ишмухаметов А.А., Колясникова Н.М. Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов желтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластомы и карциномы поджелудочной железы. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 536–548. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-204> EDN: <https://elibrary.ru/laquqr>**Финансирование.** Исследование выполнено за счет государственного задания Минобрнауки России «Изучение патогенного и онколитического потенциала вируса клещевого энцефалита, возбудителей других трансмиссивных инфекций и их рекомбинантных производных» FNZG-2022-0009.**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-204>

Investigation of oncolytic potential of vaccine strains of yellow fever and tick-borne encephalitis viruses against glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines

Alina S. Nazarenko¹, Yulia K. Biryukova¹✉, Ekaterina A. Orlova¹, Kirill N. Trachuk¹, Alla L. Ivanova¹, Alla V. Belyakova¹, Nikolai B. Pestov¹, Mikhail F. Vorovitch^{1,2}, Aydar A. Ishmukhametov^{1,2}, Nadezhda M. Kolyasnikova¹

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 108819, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Institute of Translational Medicine and Biotechnology, 119048, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Flaviviruses, possessing natural neurotropicity could be used in glioblastoma therapy using attenuated strains or as a delivery system for antitumor agents in an inactivated form.

Objective. To investigate the sensitivity of glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines to vaccine strains of yellow fever and tick-borne encephalitis viruses.

Materials and methods. Cell lines: glioblastoma GL-6, T98G, LN-229, pancreatic carcinoma MIA RaCa-2 and human pancreatic ductal carcinoma PANC-1. Viral strains: 17D yellow fever virus (YF), Sofjin tick-borne encephalitis virus (TBEV). Virus concentration were determined by plaque assay and quantitative PCR. Determination of cell sensitivity to viruses by MTT assay.

Results. 17D YF was effective only against pancreatic carcinoma tumor cells MIA Paca-2 and had a limited effect against PANC-1. In glioblastoma cell lines (LN229, GL6, T98G), virus had no oncolytic effect and the viral RNA concentration fell in the culture medium. Sofjin TBEV showed CPE₅₀ against MIA Paca-2 and a very limited cytotoxic effect against PANC-1. However, it had no oncolytic effect against glioblastoma cell lines (LN229, T98G and GL6), although virus reproduction continued in these cultures. For the GL6 glioblastoma cell line, the viral RNA concentration at the level with the infection dose was determined within 13 days, despite medium replacement, while in the case of the LN229 cell line, the virus concentration increased from 1×10^9 to 1×10^{10} copies/ml.

Conclusion. Tumor behavior in organism is more complex and is determined by different microenvironmental factors and immune status. In the future, it is advisable to continue studying the antitumor oncolytic and immunomodulatory effects of viral strains 17D YF and Sofjin TBEV using *in vivo* models.

Keywords: *Oncolytic viruses; flaviviruses; yellow fever virus; tick-borne encephalitis virus; glioblastoma cell; pancreatic carcinoma cell; virus sensitivity; viral oncolysis*

For citation: Nazarenko A.S., Biryukova Yu.K., Orlova E.A., Trachuk K.N., Ivanova A.L., Belyakova A.V., Pestov N.B., Vorovitch M.F., Ishmukhametov A.A., Kolyasnikova N.M. Investigation of oncolytic potential of vaccine strains of yellow fever and tick-borne encephalitis viruses against glioblastoma and pancreatic carcinoma cell lines. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 68(6): 536–548 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-204> EDN: <https://elibrary.ru/laqurr>

Funding. The research was funded by the State budget with the support of the Ministry of Education and Science of Russia «Study of pathogenic and oncolytic potential of tick-borne encephalitis virus, pathogens of other vector-borne infections and their recombinant derivatives» FNZG-2022-0009.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Введение

Проблема терапии злокачественных заболеваний по-прежнему остается нерешенной. Существующие терапевтические подходы способны вызывать ремиссии разной протяженности, но не обеспечивают полного выздоровления, поскольку в ответ на терапию происходит отбор устойчивых опухолевых клеток. Онколитическая виротерапия – активно развивающееся направление исследований в последние годы. На основе онколитических вирусов уже разработан ряд препаратов, зарегистрированных для терапии злокачественных заболеваний, и еще десятки находятся

на разных стадиях клинических исследований [1–3]. Развитие онколитической виротерапии в нашей стране имеет давнюю историю [4]. Лидирующее положение на территории бывшего СССР занимала исследовательская группа под руководством М.К. Ворошиловой (лаборатория иммунологии энтеровирусов, Институт полиомиелита, Москва), которая активно изучала онколитический потенциал энтеровирусов [5]. Исследователи показали, что живые энтеровирусные вакцины стимулируют клеточный иммунитет у онкологических больных и потенциально могут быть эффективными для лечения пациентов с опухолями желудочно-

кишечного тракта [6, 7]. Работа по созданию панелей препаратов на основе онколитических энтеровирусов и персонализированного подхода к пациентам с учетом молекулярно-биологических механизмов тропизма к конкретным опухолям продолжается в настоящее время группой под руководством проф. М.П. Чумакова [8–10]. Еще одним перспективным подходом для онко-виротерапии является использование рекомбинантных аденовирусов, в частности, в качестве вероятно наиболее перспективных кандидатов для виротерапии злокачественных глиобластом [11–13]. В ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск) был создан противоопухолевый препарат «Канцеролизин» на основе мутантного варианта Ade12 аденовируса человека серотипа 5, который с эффективностью, близкой к вирусу дикого типа, инфицирует опухолевые клетки, дефектные по p53, а также создана клеточная линия на основе клеток 293, которая может быть использована для масштабируемого получения данного вируса [14]. В экспериментах на лабораторных животных (мыши, кролики, морские свинки) в доклинических исследованиях канцеролизина была показана его безвредность и безопасность [15, 16]. В ГНЦ «Вектор» на основе вируса осповакцины штамма L-IVP был также сконструирован онколитический вирус, обеспечивающий доставку противораковых терапевтических генов в клетки макроорганизма. В рекомбинантный вирус L-IVP_опсоМ был встроен ген, кодирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, и синтетический ген, кодирующий полиэпитопный иммуноген, состоящий из эпитопов антигенов, гиперэкспрессирующихся в клетках меланомы. Онколитическую эффективность полученного рекомбинантного вируса оценивали с помощью мышинной модели ксенографтов с использованием злокачественных клеток SK-Mel-28 [17].

В последние годы, помимо изучения патогенного потенциала представителей рода флавириусов, активно изучается их онколитический потенциал [18]. Вирусам свойственно заражать и лизировать клетки, причем опухолевые клетки, как правило, приобретают повышенную чувствительность к вирусам, благодаря поломкам в механизмах контроля клеточного деления и внутриклеточной противовирусной защиты. Показано, что онколитические вирусы способны также стимулировать противоопухолевый иммунитет [19]. С точки зрения иммуногенности флавириусы могут играть положительную роль в терапии опухоли и приводить к ее лизису иммуноопосредованным способом. Однако флавириусы в качестве онколитических вирусов малоизучены, хотя они имеют природную нейротропность и могут использоваться для лечения, например, глиобластом, при использовании безопасных для человека штаммов или в качестве системы доставки противоопухолевых агентов в инактивированном виде.

Род *Orthoflavivirus* [20] включает более 70 арбовирусов, которые являются трансмиссивными и переносятся комарами и клещами. Геном флавириусов представлен кэпированной одноцепочечной РНК по-

ложительной полярности длиной около 11 тыс. нуклеотидов с единственной открытой рамкой считывания. Больше всего исследований на предмет онколитической активности среди флавириусов посвящено вирусу Зика. Вирус Зика является слабопатогенным для человека, у взрослых пациентов инфекция, вызванная вирусом Зика, обычно протекает бессимптомно, лишь небольшой процент пациентов (< 20%) сообщают о легкой лихорадке, сыпи и боли в суставах в течение примерно 7 сут. В ряде работ было продемонстрировано, что вирус Зика избирательно инфицирует нервные стволовые клетки плода [2], которые имеют некоторое сходство с клетками глиобластомы. Эффективность вируса Зика в отношении глиобластом была также показана на модели *in vitro* и *in vivo* [21]. Авторы отметили, что вирус Зика избирательно заражал клетки глиобластомы, полученные от пациентов после резекции, в сравнении с нейронами и глиальными клетками. Авторы также использовали вирус Зика для терапии глиобластомы мыши GL261 и СТ-2А. В результате наблюдалось увеличение продолжительности жизни мышей C57BL/6, получавших терапию, в сравнении с контрольной группой, уменьшение объема опухоли проходило без неврологических симптомов. Кроме того, избирательность репликативной активности вируса Зика в отношении клеток глиобластомы U87 MG человека была продемонстрирована в исследовании В.А. Святченко и соавт. на модели с использованием иммунодефицитных SCID мышей с привитыми подкожными ксенографтами глиобластомы U87 MG [22].

Еще один флавириус, обладающий онколитическим потенциалом, – вирус желтой лихорадки (ВЖЛ). ВЖЛ вызывает серьезное инфекционное заболевание, возбудитель которого передается при укусе комаров *Aedes aegypti* [23]. Атенуированный штамм 17D ВЖЛ полностью секвенирован, имеет хороший профиль безопасности у иммунокомпетентных детей и взрослых, вакцина на его основе используется в профилактических целях для предотвращения заболевания в эндемичных регионах [24]. Недавнее исследование на мышках при внутриопухолевой терапии подкожных опухолей меланомы и карциномы толстой кишки продемонстрировало эффективность штамма 17D ВЖЛ как иммуномодулирующего агента, приводящего к задержке роста опухолей [25]. Таким образом, штамм 17D ВЖЛ можно рассматривать в качестве потенциального онколитического агента.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) изучали на предмет онколитической активности только в 50-х годах прошлого столетия. Е.Н. Левкович и Л.Г. Карпович (лаборатория клещевого энцефалита, Институт полиомиелита, Москва, СССР) исследовали 25 штаммов ВКЭ и родственных ему вирусов, включая вирус шотландского энцефаломиелита овец, вирус омской геморрагической лихорадки, вирус Кьясанурской лесной болезни, вирус Лангат. Было показано, что вирусы, которые хорошо репродуцируются в организме человека, также активно размножаются в клетках HeLa, однако их цитопатогенное действие сильно варьирует [26]. В исследовании Е.Н. Левкович

и Г.И. Сергеевой было выявлено ингибирующее действие всех изученных штаммов ВКЭ на рост асцитной карциномы Эрлиха и саркомы Крокера *in vitro*. ВКЭ, а также вирус Лангат оказались способными инфицировать опухолевые клетки с последующим снижением их пролиферативной способности и задержкой роста опухоли при трансплантации клеток экспериментальным животным [27, 28]. Однако из-за высокой патогенности ВКЭ и отсутствия на тот момент возможности генетически модифицировать вирус, исследования его онколитических свойств были прекращены. На сегодняшний день ВКЭ можно рассматривать в качестве онколитического вируса при условии должных генетических модификаций, приводящих к его полной аттенуации.

Цель работы – исследование чувствительности клеточных линий глиобластомы и карциномы поджелудочной железы к вакцинным штаммам 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ.

Материалы и методы

Клеточные линии и условия культивирования

Перевиваемая культура клеток почечного эпителия зеленой мартышки Vero (получены из Американской коллекции клеточных культур – АТСС) и культура эмбриональной почки свиньи (СПЭВ) (из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») были использованы для титрования вируса методом бляшек; клеточную линию глиобластомы GL-6 (ФГБУН ИМБ РАН), клеточные линии глиобластомы T98G, LN-229 (АТСС), клеточные линии карциномы поджелудочной железы MIA PaCa-2 и протоковой карциномы поджелудочной железы человека PANC-1 (ИБХ РАН) использовали для определения чувствительности к вирусам.

Клетки культивировали в питательной (ростовой) среде DMEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»), с добавлением 2 mM L-глутамин («ПанЭко», кат. № Ф032), антибиотиков пенициллина (250 МЕ/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл) («ПанЭко», кат. № А065п) и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (FBS Gibco #2412072) в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. В качестве поддерживающей среды после заражения клеток вирусами использовали среду «Игла MEM» (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») с идентичными добавками, как и в случае с DMEM, но с добавлением 2% ЭТС.

Вирусные штаммы

В работе использовали аттенуированный вакцинный штамм 17D ВЖЛ, вакцинный штамм Софьин ВКЭ из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Титры вирусов оценивали методом бляшек, концентрацию вирусной РНК в культуральной среде – методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Титрование вирусов методом бляшек

Титры вируса определяли методом бляшек под покрытием 1,26% метилцеллюлозы в культуре клеток Vero

(для ВЖЛ) и СПЭВ (для ВКЭ) на пластиковых 12-луночных планшетах. Клетки высевали на 12-луночные планшеты и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. На среде 199 с солями Эрла готовили 10-кратные разведения вирусных образцов и добавляли их к клеткам в объеме 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 1 ч при осторожном покачивании. Затем в каждую лунку вносили 1 мл 1,26% метилцеллюлозы.

Учет бляшек проводили на 8-е сутки после заражения. Титр вируса выражали в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл вирусосодержащего материала. Титр рассчитывали по формуле:

$$\Sigma N/(d \times n \times V) = \text{БОЕ/мл},$$

где: N – количество бляшек в одной лунке для соответствующего разведения; n – количество лунок для одного разведения, шт.; V – объем пробы (дозы для заражения), мл; d – разведение (в виде 10-х).

Определение концентрации вирусной РНК в культуральной среде методом ПЦР в реальном времени

Пробу культуральной среды отбирали в объеме 1 мл, клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Выделение РНК вируса из полученного супернатанта проводили с помощью набора реагентов «Рибо-преп», обратную транскрипцию (получение кДНК) осуществляли с помощью набора «Реверта-Л». При проведении ПЦР для ВКЭ использовали набор реагентов «Амплиценс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL» с применением калибраторов с известной концентрацией кДНК: 1 × 10⁹, 1 × 10⁷, 1 × 10⁵ ГЭ/мл. При проведении ПЦР для ВЖЛ применяли набор реагентов «Амплиценс Yellow fever virus-FL», в качестве стандартов использовали штамм 17D ВЖЛ в титре 1 × 10⁷, 1 × 10⁵, 1 × 10³ БОЕ/мл. Производителем всех использованных наборов реагентов является ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва). Количественную ПЦР в реальном времени выполняли на термическом циклере Rotor-Gene Q 6plex (Qiagen) с помощью каналов детекции (FAM, HEX) и определением цикла детекции (C_t).

Определение чувствительности клеток к вирусам

1. **Цитопатическое действие (ЦПД).** Клетки сажали на 25 см² матрасы и культивировали до образования монослоя. Заражение проводили в минимальном объеме 250 мкл вирусосодержащей жидкостью в титрах 10⁷ БОЕ/мл в течение 1 ч при 37 °С с покачиванием. Затем монослой клеток отмывали и добавляли поддерживающую среду. ЦПД наблюдали в течение 14 сут. Начиная с 3-х суток с помощью световой микроскопии оценивали ЦПД. Учет ЦПД проводили визуально по системе крестов: если изменению (по сравнению с контролем) подвергся весь монослой в матрасе, ЦПД оценивали на 4 креста (++++), если ¾ – на 3 (+++), если ½ – на 2 (++) , если на ¼ – на 1 крест (+).

2. **МТТ-тест.** 96-луночные планшеты с клетками перевиваемых опухолевых линий инфицирова-

ли 10-кратными серийными разведениями вирусов в шести повторах. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37 °С в CO₂ инкубаторе в объеме 30 мкл на лунку, далее удаляли вирусосодержащую жидкость, промывали клетки средой без сыворотки и культивировали в поддерживающей среде с 2% ЭТС. Через 3, 4, 5 сут определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста, используя реагент МТТ в рабочей концентрации 5 мг/мл в фосфатном буфере рН 7,2 («ПанЭко», кат. № О104). С помощью планшетного ридера Bio-Rad iMark определяли оптическую плотность при длине волны 595/650 нм. Результат оценивали в сравнении со средней оптической плотностью в контроле (неинфицированные клетки), принимая ее за 100%.

Формирование тканевых сфероидов

Формирование тканевых сфероидов производили с помощью агарозных форм, изготовленных с применением силиконовых матриц (любезно предоставленных И.В. Зубаревым) согласно инструкции производителя (ЧУ Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», Россия) [29].

Микроскопия

Визуальный контроль, фотографии клеток и сфероидов производили с применением инвертированного биологического микроскопа OLYMPUS CKX53, оснащенного цифровой камерой и ПО ADFImageCapture.

Статистически анализ.

Статистическую оценку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 с использованием диспер-

сионного анализа ANOVA для МТТ-теста, критерия Краскела–Уоллиса для ПЦР.

Результаты

Исследовали чувствительность опухолевых клеточных линий глиобластом GL6, LN-229, T98G, карциномы поджелудочной железы MIA Pasa-2 и протоковой карциномы поджелудочной железы PANC-1 к штаммам 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ. С целью определения минимального титра вируса, необходимого для достижения ЦПД, клеточные культуры инкубировали с серийными 10-кратными разведениями ВЖЛ и ВКЭ. Через 5 сут после заражения оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста. На **рис. 1 (а, б)** представлены результаты чувствительности исследуемых клеточных линий к штаммам 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на 5-е сутки после заражения клеток. Полученные профили чувствительности указывают, что наибольший цитопатический эффект штаммы 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ проявляют в отношении клеточной линии MIA Pasa-2, частичный – в отношении PANC-1, полное отсутствие ЦПД наблюдается в отношении трех исследуемых культур глиобластом.

Минимальный титр ВЖЛ при заражении для достижения полной клеточной гибели в отношении MIA Pasa-2 составил 10⁶ БОЕ/мл, а ЦПД₅₀ достигалось при титре вируса 10³ БОЕ/мл. При воздействии штамма Софьин ВКЭ полного клеточного лизиса в культуре MIA Pasa-2 не происходило, ЦПД₅₀ достигалось при минимальном титре вируса 10⁴ БОЕ/мл. Оба исследуемых вирусных штамма даже при титре заражения 10⁷ БОЕ/мл не вызывали полного клеточного лизиса клеток PANC-1, при этом ЦПД₅₀ достига-

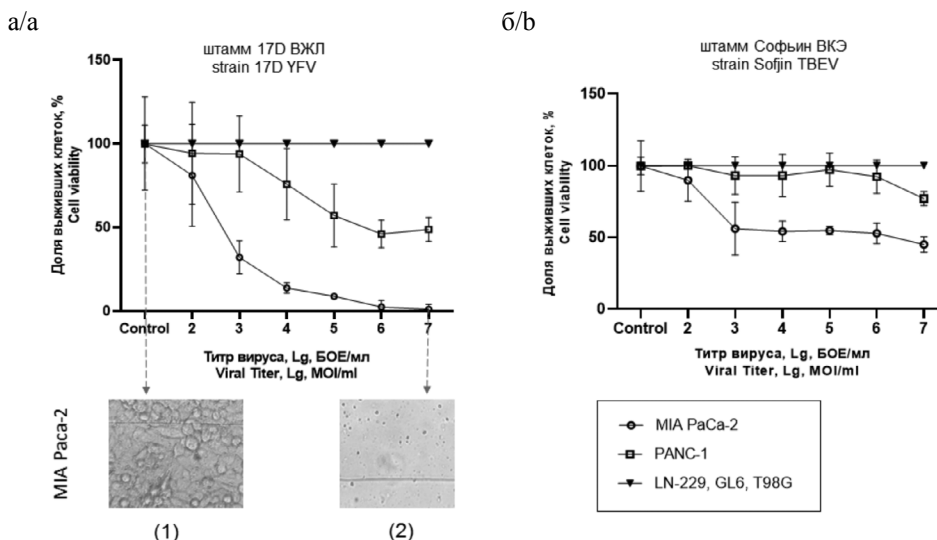


Рис. 1. Чувствительность клеточных линий глиобластом GL6, LN-229, T98G, карциномы поджелудочной железы MIA Pasa-2 и протоковой карциномы поджелудочной железы PANC-1 к штамму 17D ВЖЛ (панель а) и штамму Софьин ВКЭ (панель б) в зависимости от титра вируса при заражении по результатам оценки доли выживших клеток с помощью МТТ-теста на 5-е сутки после инфицирования.

Фотографии клеток MIA Pasa-2. Ув. ×100. а(1) – контрольной лунки, монослой сохранен; а(2) – инфицированной, полный клеточный лизис.

Fig. 1. Sensitivity of glioblastoma cells GL6, LN-229, T98G, pancreatic carcinoma MIA Pasa-2 and pancreatic ductal carcinoma PANC-1 cell to strain 17D YFV (panel a) and strain Sofjin TBEV (panel b) depending on the virus titer at the infection as assessed by the proportion of surviving cells using the MTT test at 5 days post-infection.

Photographs of MIA Pasa-2 cells. Magnification ×100. а(1) – control well, monolayer preserved; а(2) – infected well, complete cell lysis.

лось к 5-м суткам при воздействии штамма 17D ВЖЛ в титре 10^6 БОЕ/мл, а в случае штамма Софьин ВКЭ ЦПД₅₀ на клетках PANC-1 наблюдали на 3-и сутки при титре заражения 10^7 БОЕ/мл, к 5-м суткам цитопатический эффект значительно снижался (табл. 1).

Исследуемые культуры того же пассажа вели на 25 см² матрасах с последующим заражением ВЖЛ и ВКЭ с целью оценки ЦПД и отбора проб культуральной среды для определения концентрации вируса методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Результаты оценки ЦПД для штамма 17D ВЖЛ при культивировании клеточных линий на матрасах коррелировали с данными МТТ-теста: при титре заражения 10^7 БОЕ/мл к 5-м суткам ЦПД достигало результата «4 креста» в отношении клеточной линии MIA Paca-2 и «2 креста» в отношении клеточной линии PANC-1. По данным ПЦР, при заражении штаммом 17D ВЖЛ в титре 1×10^7 БОЕ/мл (ПЦР 1×10^6 ГЭ/мл) концентрация вирусной РНК в культуральной среде возрастала, что свидетельствует о репликации вируса в данных клеточных линиях

и объясняет выраженный онколитический эффект ВЖЛ в их отношении (табл. 2). ЦПД штамма Софьин ВКЭ при заражении клеток в титре 4×10^7 БОЕ/мл к 5-м суткам в отношении клеточной линии MIA Paca-2 оценивали как «3 креста», в отношении клеточной линии PANC-1 – как «1 крест». По результатам ПЦР, концентрация вирусной РНК в культуральной среде MIA Paca-2 и PANC-1 к 5-м суткам была выше исходной (в момент заражения) – 2×10^9 ГЭ/мл, при этом в клетках MIA Paca-2 концентрация вирусной РНК ВКЭ была на порядок выше (табл. 2).

Отсутствие ЦПД наблюдали в отношении клеточных линий глиобластом LN229 и T98G при заражении штаммом 17D ВЖЛ в титре 10^7 БОЕ/мл, и лишь в отношении клеточной линии GL6 было отмечено небольшое разрушение монослоя, оцениваемое в «1 крест» (на 3-и сутки эксперимента), однако в последующем усиления ЦПД в клеточной линии GL6 не было зафиксировано вплоть до 13-х суток. Результаты МТТ-теста коррелировали с данными ЦПД, была зарегистрирована полная выживаемость исследуе-

Таблица 1. Результаты определения минимального титра заражения вирусом (штаммы 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ) в отношении клеточных линий карцином (MIA Paca-2, PANC-1) и глиобластом (GL6, LN-229, T98G)

Table 1. Results of determining the minimum titer of virus infection (strain 17D YFV and strain Sofjin TBEV) in carcinoma (MIA Paca-2, PANC-1) and glioblastoma (GL6, LN-229, T98G) cell lines

Минимальный титр вируса при заражении, БОЕ/мл Minimum virus titer at infection, MOI/ml	Штамм 17D ВЖЛ Strain 17D YFV		Штамм Софьин ВКЭ Strain Sofjin TBEV	
	ЦПД ₅₀ CPE ₅₀	Полный клеточный лизис Total cell lysis	ЦПД ₅₀ CPE ₅₀	Полный клеточный лизис Total cell lysis
5-е сутки эксперимента 5 th day of the experiment				
MIA Paca-2	10^3	10^6	10^4	–
PANC-1	10^6	–	10^{7*}	–
GL6, LN-229, T98G	–	–	–	–

Примечание. «←» – нет эффекта; * – ЦПД₅₀ – эффект наблюдается только на 3-и сутки.

Note. «←» – no effect; * – CPE₅₀ – effect observed only on day 3 at titer of 10^7 MOI/ml.

Таблица 2. Изменение концентрации вирусной РНК в культуральной среде при инфицировании (0-е сутки) карцином поджелудочной железы MIA Paca-2 и PANC-1 штаммами 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на 3, 4, 5-е сутки эксперимента

Table 2. Changes in viral RNA concentration in the culture medium following infection (day 0) of pancreatic carcinomas MIA Paca-2 and PANC-1 strains 17D YFV and Sofjin TBEV on days 3, 4, 5 of the experiment

Вирус Virus	Штамм 17D ВЖЛ Strain 17D YFV				Штамм Софьин ВКЭ Strain Sofjin TBEV				
	Сутки Days								
Клеточные линии Cell Lines	0	3	4	5	0	3	4	5	
MIA Paca-2	ЦПД, БОЕ/мл CPE, MOI/ml	1×10^7	++	+++	++++	4×10^7	+	++	+++
	ПЦР, ГЭ/мл PCR, gE/ml	1×10^6	$2,3 \times 10^8$	–	$1,6 \times 10^8$	2×10^9	$1,3 \times 10^{11}$	–	$1,2 \times 10^{11}$
PANC-1	ЦПД, БОЕ/мл CPE, MOI/ml	1×10^7	отсутствует	++	++	4×10^7	отсутствует	+	+
	ПЦР, ГЭ/мл PCR, gE/ml	1×10^6	$9,6 \times 10^7$	–	$6,2 \times 10^7$	2×10^9	$6,1 \times 10^{10}$	–	$8,8 \times 10^{10}$

Примечание. «←» – не исследовалось.

Note. «←» – not investigated.

мых клеточных линий глиобластом на 5-е сутки эксперимента (рис. 1). На 5, 7, 10, 13-е сутки и в случае GL6 также и на 3-и сутки отбирали пробы для оценки концентрации 17D ВЖЛ методом количественной ПЦР в режиме реального времени, при этом на 5-е и 10-е сутки производили замену среды (3-и, 10-е сутки в случае GL6). По результатам ПЦР было выявлено снижение концентрации РНК 17D ВЖЛ в культуральной жидкости для всех исследуемых линий глиобластом (рис. 2). Полученные результаты указывают на отсутствие онколитического эффекта в отношении глиобластом для штамма 17D ВЖЛ.

При инфицировании клеточных линий штаммом Софьин ВКЭ ЦПД отсутствовало, однако результаты ПЦР-исследования культуральной жидкости показали, что ВКЭ размножается в клеточных линиях LN229 и GL6. Было проведено 2 независимых эксперимента. Первый эксперимент был более коротким – продолжительностью 5 сут, во втором, более длительном эксперименте на 5-е и 10-е сутки (3-и, 10-е сутки в случае GL6) была произведена замена культуральной среды. В культуральной жидкости клеточной линии LN229 при заражении ВКЭ в титре 1×10^7 БОЕ/мл (ПЦР 1×10^9 ГЭ/мл) концентрация РНК вируса достигла максимальной отметки к 5-м и 10-м суткам и составила $1,3 \times 10^{11}$ и 7×10^{10} ГЭ/мл соответственно. Для клеточной линии GL6 максимальная концентрация РНК ВКЭ в культуральной жидкости наблюдалась к 3-м суткам эксперимента и достигла $9,6 \times 10^{10}$ и 4×10^{10} ГЭ/мл в первом и втором экспериментах соответственно, после чего наблюдалось снижение концентрации РНК. В культуральной жидкости клеточной линии T98G концентрация РНК ВКЭ составила 10^9 ГЭ/мл и практически не менялась

в течении первых 5 сут после заражения в первом эксперименте, во втором опыте РНК ВКЭ в концентрации 10^7 ГЭ/мл определялась в культуральной жидкости вплоть до 13-х суток, однако концентрация РНК вируса была ниже в сравнении с концентрацией РНК ВКЭ в других линиях глиобластом (рис. 3).

Высокий тропизм штамма 17D ВЖЛ к карциноме поджелудочной железы MIA Pasa-2 был продемонстрирован в трехмерной культуре (сфероидах). Формирование тканевых сфероидов производили с помощью агарозных форм, приготовленных при помощи силиконовых матриц («ЗД Биопринтинг Солюшенс»). На 3-и сутки культивирования клетки MIA Pasa-2 формировались в сфероиды размером 650 мкм. После инфицирования ВЖЛ в титре 1×10^6 БОЕ/мл на после заражения 3-и сутки отмечали ЦПД и появление дефектных сфероидов в сравнении с контрольной группой (рис. 4).

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что ВЖЛ, обладая природной тропностью к клеткам гепатобилиарной системы, эффективен только в отношении опухолевых клеток карциномы поджелудочной железы. При высоких титрах заражения ВЖЛ оказывал сильное цитотоксическое действие на клетки карциномы поджелудочной железы (MIA Pasa-2) и имел ограниченный эффект в отношении карциномы протоков поджелудочной железы (PANC-1). В отношении исследованных клеточных линий глиобластом (LN229, GL6, T98G) вирус не оказывал онколитического действия, концентрация вирусной РНК в культуральной среде постепенно снижалась.

Штамм Софьин ВКЭ продемонстрировал ЦПД в отношении карциномы поджелудочной железы (MIA Pasa-2) и крайне ограниченный цитотоксический эффект в отношении протоковой карциномы подже-

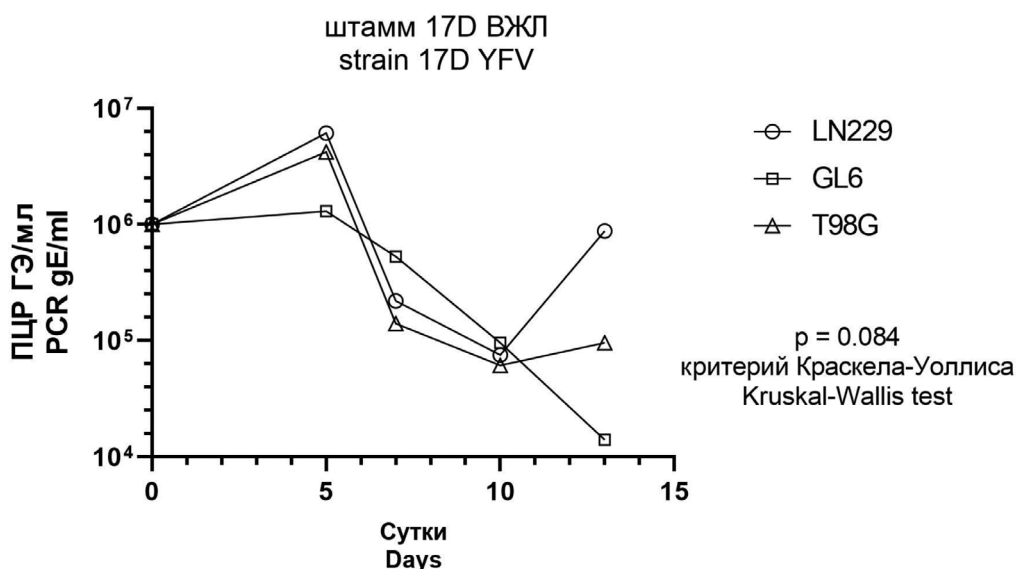


Рис. 2. Изменение концентрации вирусной РНК в культуральной среде при инфицировании (0-е сутки) глиобластом GL6, LN-229, T98G штаммом 17D ВЖЛ на 3, 5, 7, 10, 13-е сутки эксперимента.

Fig. 2. Changes in viral RNA concentration in the culture medium following infection (day 0) of GL6, LN-229, T98G glioblastomas with strain 17D YFV on days 3, 5, 7, 10, 13 of the experiment.

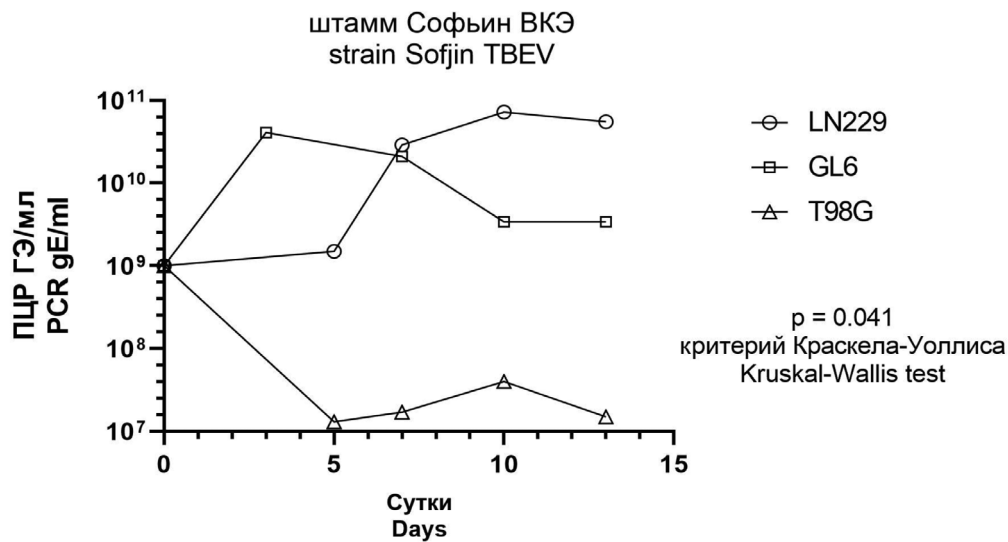
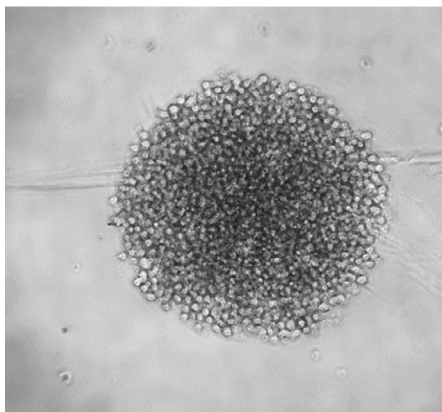


Рис. 3. Изменение концентрации вирусной РНК в культуральной среде при инфицировании (0-е сутки) глиобластомой GL6, LN-229, T98G штаммом Софьин ВКЭ на 3, 5, 7, 10, 13-е сутки эксперимента.

Fig. 3. Changes in viral RNA concentration in the culture medium following infection (day 0) of GL6, LN-229, T98G glioblastomas strain Sofjin TBEV on days 3, 5, 7, 10, 13 of the experiment.

a/a



b/b

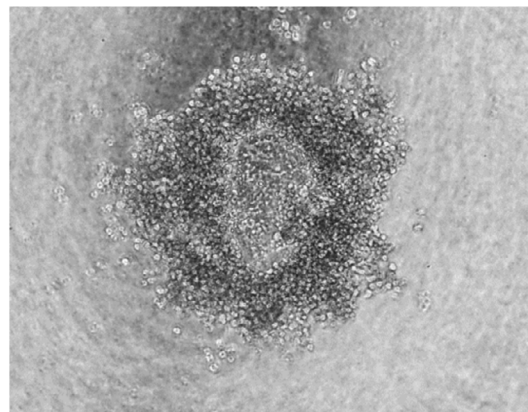


Рис. 4. Оценка ЦПД штамма 17D ВЖЛ с помощью тканевых сфероидов на культуре клеток MIA Paca-2. На фотографии вид сфероидов на 3-и сутки. Контроль – не инфицированный сфероид панель (а) и после инфицирования титром 10^6 БОЕ/мл штаммом 17D ВЖЛ – панель (б). Ув. $\times 40$.

Fig. 4. Assessment of the CPE of 17D YFV using tissue spheroids on MIA Paca-2 cell culture. The photo shows the view of spheroids at 3 days control – uninfected spheroid (panel a) and after infection with 10^6 MOI/ml strain 17D YFV – (panel b). Magnification $\times 40$.

лудочной железы (PANC-1). При этом, несмотря на природную нейротропность, вирус не оказывал онколитического эффекта в отношении клеточных линий глиобластом (LN229, T98G и GL6), хотя наблюдалась репродукция вируса в этих культурах. Так, для глиобластомы линии GL6 концентрация вирусной РНК определялась в течение 13 сут и была на уровне исходной концентрации РНК при заражении, даже при периодическом удалении культуральной среды, а в случае клеточной линии LN229 концентрация вируса увеличилась с 1×10^9 до 1×10^{10} ГЭ/мл.

Обсуждение

Исследование вакцинных штаммов 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ в отношении клеточных линий гли-

областом и карцином поджелудочной железы дает основание сделать вывод о наличии онколитического потенциала у исследуемых вирусов и возможности их применения в терапии злокачественных новообразований.

Безусловно, преимуществом штамма 17D ВЖЛ является его доказанная многолетними исследованиями безопасность и иммуногенность [30].

Сравнение полученных результаты *in vitro* с другими исследованиями достаточно сложно, так как в литературе представлены данные для опухолевых линий другого генеза. Например, в работе М. Aznat и соавт. [25] исследования выполнены на клеточных линиях рака толстой кишки, почечно-клеточного рака, рака молочной железы и меланомы. Штамм 17D ВЖЛ

проявлял цитопатическое действие, в то время как на нетрансформированных фибробластах человека цитотоксические эффекты отсутствовали. При прививании карциномы толстой кишки MC38 и меланомы B16OVA мышам C57BL/6 с последующим внутриопухолевым введением вируса наблюдалась задержка роста опухоли. Таким образом, штамм 17D ВЖЛ можно рассматривать в качестве потенциального онколитического агента.

Тот факт, что вакцина на основе штамма 17D ВЖЛ является широко используемым профилактическим средством для подкожной или внутримышечной вакцинации, значительно упрощает возможную клиническую разработку стратегий иммунотерапии, включающих внутриопухолевые инъекции. Дополнительно повысить эффективность терапии можно путем введения в клетку опухоли последовательностей, кодирующих гены-супрессоры опухоли, гены «смерти» или гены цитокинов, усиливающих индукцию иммунного ответа на опухолевые антигены, например, путем создания рекомбинантных векторов на основе 17D, несущих монотела с убиквитин-лигазами VHL и MDM2 для таргетного разрушения онкогенов типа K-RAS.

Вакцинный штамм Софьин ВКЭ является нейротропным, свободно преодолевает гематоэнцефалический барьер и способен вызывать энцефалопатию [31], поэтому применение его *in vivo* как противоопухолевого агента возможно только после предварительной иммунизации реципиентов инактивированной вакциной или при генетической модификации ВКЭ для улучшения его профиля безопасности. Ранее уже были проведены исследования ВКЭ-штаммов дальневосточного подтипа, к которым относится и штамм Софьин в качестве возможных онколитических агентов. Результаты показали ингибирование роста подкожных опухолей мышей различной этиологии (фибросаркома MCI, нейробластома мышцы C1300, аденокарцинома молочной железы EO 771, остеогенная саркома Ridgeway, саркомы T241 и 180), однако такие исследования проводились очень давно, в 1950-х гг. [27, 28, 32, 33]. Таким образом, штамм Софьин ВКЭ потенциально можно рассмотреть в качестве онколитического вируса при условии обеспечения безопасности его применения.

Полученные в настоящем исследовании результаты *in vitro* также подтверждают, что штаммы 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ имеют перспективы в онковиротерапии. Разумеется, клеточные культуры не в полной мере отражают патофизиологию опухолевых клеток в системе *in vivo*. Поведение опухоли в организме определяется как опухолевыми клетками, так и клетками стромального микроокружения, внеклеточным матриксом, влиянием гипоксии, а микроокружение опухоли характеризуется наличием большого количества воспалительных цитокинов, факторов роста и других факторов, поддерживающих рост и метастазирование опухоли [34, 35]. В связи с вышесказанным в дальнейшем планируется продолжить изучение противоопухолевых онколитических и иммуномодулиру-

ющих эффектов штаммов 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ на моделях *in vivo*. Поскольку акцент нами делается именно на иммунологические эффекты, планируются эксперименты на иммунокомпетентных животных с использованием сингенных моделей подкожного опухолевого роста клеток рака поджелудочной железы (PAN02) и глиомы (GL261). Исследование на иммунокомпетентных животных позволит также получить данные по усилению эффекта при предварительной иммунизации животных, а в случае ВКЭ Софьин исследование возможно только при условии предварительной иммунизации инактивированной вакциной ВКЭ.

Также в дальнейшем для понимания механизмов вирусного онкотропизма целесообразно проводить исследования с культурами клеточных опухолевых линий, полученных из опухолей (послеоперационный материал) от пациентов. Так в исследовании А.В. Липатовой и соавт. [36] был применен мультиомный анализ с целью изучения вклада интерферонзависимых противовирусных механизмов в опухолевых клетках мультиморфной глиобластомы, полученных от отдельных пациентов, на устойчивость к онколитическим вирусам, принадлежащим к разным вирусным семействам.

Заключение

Штаммы 17D ВЖЛ и Софьин ВКЭ оказывали цитопатическое действие на клеточные линии рака поджелудочной железы человека при увеличении репродукции вируса в культуральной среде. Резистентность к исследуемым вирусам клеточной линии протоковой карциномы поджелудочной железы PANC-1 была выше, чем карциномы поджелудочной железы MIA Pasa-2, что, возможно, связано с повышенной экспрессией IRF2 и IRF7, которые регулируют гены интерферона- α и - γ , в данной клеточной линии [37, 38].

Также следует отметить способность штамма 17D ВЖЛ лизировать 3D-сфероиды клеточной линии MIA Pasa-2, что, вероятно, определяет возможность вируса проникать между плотными контактами опухолевых клеток.

В настоящем исследовании штамм Софьин ВКЭ по литическому действию на опухолевые клеточные линии явно уступал штамму 17D ВЖЛ, однако способность его к репликации в клеточных линиях глиобластомы требует дальнейшего изучения *in vivo* на модели иммунокомпетентных животных с учетом проработки вопроса безопасности его применения путем дополнительной генно-инженерной модификации вируса или предварительной иммунизации животных инактивированной вакциной. Ввиду того, что флавивирусы являются высокоэффективными иммуногенами, мы предполагаем, что лизис или задержка роста опухоли могут быть достигнуты иммуноопосредованным путем благодаря репликации вируса в опухолевых тканях.

В заключение следует отметить, что применение флавивирусов для онковиротерапии опухолей может оказаться перспективным. Флавивирусы могут быть

использованы как непосредственно для лизиса опухолевых клеток, так и для иммуно-опосредованной индукции лизиса опухоли через активацию Т-клеточного звена иммунитета, способствуя преобразованию «холодных» опухолей в «горячие» для увеличения числа иммуночувствительных клеток опухоли и повышения эффективности терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клаан Н.К., Акиншина Л.П., Пронина Т.А. Онколитические вирусы в терапии злокачественных новообразований. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018; 17(4): 6–19. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-4-6-19> <https://elibrary.ru/ybsnsh>
2. Li K., Zhao Y., Hu X., Jiao J., Wang W., Yao H. Advances in the clinical development of oncolytic viruses. *Am. J. Transl. Res.* 2022; 14(6): 4192–206.
3. Macedo N., Miller D.M., Haq R., Kaufman H.L. Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J. Immunother. Cancer.* 2020; 8(2): e001486. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001486>
4. 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. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2023; 24(2): 266–78. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220516121813>
5. Tsyppin L.B., Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Lavrova I.K., Koroleva G.A. The morphology of tumors of the human gastrointestinal tract in short-term organ culture and the reaction of these tumors to infection with poliovirus. *Cancer.* 1976; 38(4): 1796–806. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197610\)38:4%3C1796::aid-cn-cr2820380457%3E3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197610)38:4%3C1796::aid-cn-cr2820380457%3E3.0.co;2-y)
6. Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Gorbachkov E.A., Chumakov P.M., Oganian T.G., Kodkind G.H. *Studies on Cellular Immunity of Oncology Patients in the Process of Asymptomatic Enteroviral Infection*. Riga: Zinātne; 1977: 17–20.
7. Voroshilova M.K., Vaganova N.T. *Treatment of Patients with Gastro-Intestinal Tract Tumors with Live Enteroviral Vaccines*. Riga: Zinātne; 1969.
8. Соболева А.В., Липатова А.В., Кочетков Д.В., Чумаков П.М. Изменения чувствительности клеток глиобластомы человека к онколитическим энтеровирусам при пассировании в культуре. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2018; (2): 40–4. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.025> <https://elibrary.ru/xttuyx>
9. Сосновцева А.О., Желтухин А.О., Липатова А.В., Чумаков П.М., Чехонин В.П. Исследование онколитической активности вакцинного штамма полиовируса 3-го типа на модели клеток глиомы крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019; 167(1): 120–4. <https://elibrary.ru/yqxlbb>
10. Желтухин А.О., Соболева А.В., Сосновцева А.О., Ле Т.Х., Ильинская Г.В., Кочетков Д.В. и др. Энтеровирусы человека проявляют избирательную онколитическую активность на модели ксенотрансплантатов мультиформной глиобластомы человека в иммунодефицитных мышах. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2018; (2): 45–51. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.026> <https://elibrary.ru/xttuzf>
11. Stepanenko A.A., Sosnovtseva A.O., Valikhov M.P., Chekhonin V.P. A new insight into aggregation of oncolytic adenovirus Ad5-delta-24-RGD during CsCl gradient ultracentrifugation. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 16088. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94573-y>
12. Romanenko M.V., Dolgova E.V., Osipov I.D., Ritter G.S., Sizova M.S., Proskurina A.S., et al. Oncolytic effect of adenoviruses serotypes 5 and 6 against U87 glioblastoma cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2019; 39(11): 6073–86. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13815>
13. Святченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. Онколитические аденовирусы в терапии злокачественных новообразований: современное состояние и перспективы. *Молекулярная биология*. 2012; 46(4): 556. <https://elibrary.ru/nmmprj>
14. Вдовиченко Г.В., Радаева И.Ф., Сергеев А.А., Колокольцова Т.Д., Нечаева Е.А., Ильина Т.В. и др. Создание банков перевиваемой культуры клеток 293 для производства антиракового вирусного лечебного препарата «Канцеролизин». *Биотехнология*. 2006; (1): 62–7. <https://elibrary.ru/ibpdar>
15. Вдовиченко Г.В., Петриченко В.А., Сергеев А.А., Ким И.И., Фатюхина О.Е., Шишкина Л.Н. и др. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата канцеролизин. *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(6): 39–42. <https://elibrary.ru/hylfpr>
16. Вдовиченко Г.В., Петриченко В.А., Сергеев А.А., Ким И.И., Фатюхина О.Е., Шишкина Л.Н. и др. Изучение реактогенности, безопасности и специфической активности противоракового лечебного препарата «Канцеролизин» на животных. *Биотехнология*. 2006; (2): 66–72. <https://elibrary.ru/ibpdgv>
17. Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Максютов А.З., Таранов О.С., Соловьева О.И., Разумов И.А. и др. Рекомбинантный вирус осповакцины, перспективный для лечения меланомы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2020; 38(2): 90–8. <https://doi.org/10.17116/molgen20203802190> <https://elibrary.ru/aclyje>
18. Nazarenko A.S., Vorovitch M.F., Biryukova Y.K., Pestov N.B., Orlova E.A., Barlev N.A., et al. Flaviviruses in antitumor therapy. *Viruses.* 2023; 15(10): 1973. <https://doi.org/10.3390/v15101973>
19. Lemos de Matos A., Franco L.S., McFadden G. Oncolytic viruses and the immune system: the dynamic duo. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020; 17: 349–58. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.001>
20. Postler T.S., Beer M., Blitvich B.J., Bukh J., de Lamballerie X., Drexler J.F., et al. Renaming of the genus flavivirus to orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family flaviviridae. *Arch. Virol.* 2023; 168(9): 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
21. Zhu Z., Gorman M.J., McKenzie L.D., Chai J.N., Hubert C.G., Prager B.C., et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* 2017; 214(10): 2843–57. <https://doi.org/10.1084/jem.20171093>
22. Святченко В.А., Разумов И.А., Протопопова Е.В., Демина А.В., Соловьева О.И., Завьялов Е.Л. и др. Вирус Зика обладает онколитической активностью в отношении клеток U87 глиобластомы человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019; 22(8): 1040–5. <https://doi.org/10.18699/VJ18.448> <https://elibrary.ru/yqnnul>
23. Monath T.P., Vasconcelos P.F. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 160–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>
24. Zhu X., Fan C., Xiong Z., Chen M., Li Z., Tao T., et al. Development and application of oncolytic viruses as the nemesis of tumor cells. *Front. Microbiol.* 2023; 14: 1188526. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188526>
25. Aznar M.A., Molina C., Teijeira A., Rodriguez I., Azpilikueta A., Garasa S., et al. Repurposing the yellow fever vaccine for intratumoral immunotherapy. *EMBO Mol. Med.* 2020; 12(1): e10375. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910375>
26. Левкович Е.Н., Карпович Л.Г. Сравнительное изучение вирусов группы клещевого энцефалита в культурах клеток HeLa. *Вопросы вирусологии*. 1960; (5): 30–9.
27. Левкович Е.Н., Сергеева Г.И. Ингибирующее действие вирусов комплекса клещевого энцефалита, обладающих различной нейровирулентностью, на опухоли мышей in vivo. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1967; 64(8): 88–91.
28. Сергеева Г.И., Левкович Е.Н. Изучение особенностей размножения в опухолевых клетках in vitro и in vivo отдельных вирусов комплекса клещевого энцефалита, обладающих различной степенью нейровирулентности. *Вопросы вирусологии*. 1966; 11(5): 539–45.
29. Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., et al. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells. *Biotechnol. J.* 2020; 15(5): 1900217. <https://doi.org/10.1002/biot.201900217>
30. Dutta S.K., Langenburg T. A perspective on current flavivirus vaccine development: a brief review. *Viruses.* 2023; 15(4): 860. <https://doi.org/10.3390/v15040860>
31. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008; 371(9627): 1861–71. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60800-4)
32. Moore A.E. The destructive effect of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. *Cancer.* 1949; 2(3): 525–34. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(194905\)2:3%3C525::aid-cn-cr2820020317%3E3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0142(194905)2:3%3C525::aid-cn-cr2820020317%3E3.0.co;2-o)
33. Moore A.E. Inhibition of growth of five transplantable mouse tumors by the virus of Russian Far East encephali-

- tis. *Cancer*. 1951; 4(2): 375–82. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195103\)4:2%3C375::aid-cnrcr2820040227%3E3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195103)4:2%3C375::aid-cnrcr2820040227%3E3.0.co;2-a)
34. Chiantore M.V., Mangino G., Zangrillo M.S., Iuliano M., Affabris E., Fiorucci G., et al. Role of the Microenvironment in tumorigenesis: focus on virus-induced tumors. *Curr. Med. Chem.* 2015; 22(8): 958–74. <https://doi.org/10.2174/0929867322666141212121751>
 35. Gál P., Varinská L., Fáber L., Novák Š., Szabo P., Mitrengová P., et al. How signaling molecules regulate tumor microenvironment: parallels to wound repair. *Molecules*. 2017; 22(11): 1818. <https://doi.org/10.3390/molecules22111818>
 36. Lipatova A.V., Soboleva A.V., Gorshkov V.A., Bubis J.A., Solovyeva E.M., Krasnov G.S., et al. Multi-omics analysis of glioblastoma cells' sensitivity to oncolytic viruses. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(21): 5268. <https://doi.org/10.3390/cancers13215268>
 37. Moerdyk-Schauwecker M., Shah N.R., Murphy A.M., Hastie E., Mukherjee P., Grdzlishvili V.Z. Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling. *Virology*. 2013; 436(1): 221–34. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.11.014>
 38. Sakai T., Mashima H., Yamada Y., Goto T., Sato W., Dohmen T., et al. The roles of interferon regulatory factors 1 and 2 in the progression of human pancreatic cancer. *Pancreas*. 2014; 43(6): 909–16. <https://doi.org/10.1097/mpa.000000000000116>
- ### REFERENCES
1. Klaan N.K., Akin'shina L.P., Pronina T.A. Oncolytic viruses in the therapy of malignant neoplastic diseases. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2018; 17(4): 6–19. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-4-6-19> <https://elibrary.ru/ybsnsh> (in Russian)
 2. Li K., Zhao Y., Hu X., Jiao J., Wang W., Yao H. Advances in the clinical development of oncolytic viruses. *Am. J. Transl. Res.* 2022; 14(6): 4192–206.
 3. Macedo N., Miller D.M., Haq R., Kaufman H.L. Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020. *J. Immunother. Cancer*. 2020; 8(2): e001486. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001486>
 4. 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. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2023; 24(2): 266–78. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220516121813>
 5. Tsyppin L.B., Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Lavrova I.K., Koroleva G.A. The morphology of tumors of the human gastrointestinal tract in short-term organ culture and the reaction of these tumors to infection with poliovirus. *Cancer*. 1976; 38(4): 1796–806. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197610\)38:4%3C1796::aid-cnrcr2820380457%3E3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197610)38:4%3C1796::aid-cnrcr2820380457%3E3.0.co;2-y)
 6. Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Gorbachkov E.A., Chumakov P.M., Oganian T.G., Kodkind G.H. *Studies on Cellular Immunity of Oncology Patients in the Process of Asymptomatic Enteroviral Infection*. Riga: Zinātne; 1977: 17–20.
 7. Voroshilova M.K., Vaganova N.T. *Treatment of Patients with Gastro-Intestinal Tract Tumors with Live Enteroviral Vaccines*. Riga: Zinātne; 1969.
 8. Soboleva A.V., Lipatova A.V., Kochetkov D.V., Chumakov P.M. Changes in the sensitivity of human glioblastoma cells to oncolytic enteroviruses induced by passaging. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2018; (2): 40–4. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.025> <https://elibrary.ru/uutsjs>
 9. Sosnovtseva A.O., Chekhonin V.P., Zheltukhin A.O., Lipatova A.V., Chumakov P.M. Oncolytic activity of the vaccine strain of type 3 poliovirus on the model of rat glioma C6 cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2019; 167(1): 111–5. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04472-6> <https://elibrary.ru/rdykv>
 10. Zheltukhin A.O., Soboleva A.V., Sosnovtseva A.O., Le T.Kh., Il'inskaya G.V., Kochetkov D.V., et al. Human enteroviruses exhibit selective oncolytic activity in the model of human glioblastoma multiforme xenografts in immunodeficient mice. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2018; (2): 42–8. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2018.026> <https://elibrary.ru/xuagdz>
 11. Stepanenko A.A., Sosnovtseva A.O., Valikhov M.P., Chekhonin V.P. A new insight into aggregation of oncolytic adenovirus Ad5-delta-24-RGD during CsCl gradient ultracentrifugation. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 16088. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94573-y>
 12. Romanenko M.V., Dolgova E.V., Osipov I.D., Ritter G.S., Sizova M.S., Proskurina A.S., et al. Oncolytic effect of adenoviruses serotypes 5 and 6 against U87 glioblastoma cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2019; 39(11): 6073–86. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13815>
 13. Svyatchenko V.A., Netesov S.V., Tarasova M.V., Chumakov P.M. Oncolytic adenoviruses in anticancer therapy: current status and prospects. *Molekulyarnaya biologiya*. 2012; (4): 496–507. <https://doi.org/10.1134/S0026893312040103> <https://elibrary.ru/rgfvkf>
 14. Vdovichenko G.V., Radaeva I.F., Sergeev A.A., Kolokol'tsova T.D., Nechaeva E.A., Il'ina T.V., et al. Development of banks of a 203-cell continuous culture for manufacturing the anti-tumor therapeutic preparation cancerolysin. *Biotechnologiya*. 2006; (1): 83–9. <https://elibrary.ru/iqmqwx>
 15. Vdovichenko G.V., Petrishchenko V.A., Sergeyev A.A., Kim I.I., Fatyukhina O.Ye., Shishkina L.N., et al. Preclinical studies of the anticancer adenovirus cancerolysin. *Voprosy virusologii*. 2006; 51(6): 39–42. <https://elibrary.ru/hylfpr> (in Russian)
 16. Vdovichenko G.D., Petrishchenko V.A., Sergeev A.A., Kim I.I., Fatyukhina O.E., Shishkina L.N., et al. Study on reactogenicity, safety and specific activity of an anticancer medicinal preparation cancerolysin using test animals. *Biotechnologiya*. 2006; (2): 88–96. <https://elibrary.ru/ibjlpf>
 17. Bauer T.V., Tregubchak T.V., Maksyutov A.Z., Taranov O.S., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., et al. Recombinant vaccinia virus promising for melanoma treatment. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2020; 35(2): 97–104. <https://doi.org/10.3103/S0891416820020032> <https://elibrary.ru/ujwwtp>
 18. Nazarenko A.S., Vorovitch M.F., Biryukova Y.K., Pestov N.B., Orlova E.A., Barlev N.A., et al. Flaviviruses in antitumor therapy. *Viruses*. 2023; 15(10): 1973. <https://doi.org/10.3390/v15101973>
 19. Lemos de Matos A., Franco L.S., McFadden G. Oncolytic viruses and the immune system: the dynamic duo. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020; 17: 349–58. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.001>
 20. Postler T.S., Beer M., Blitvich B.J., Bukh J., de Lamballerie X., Drexler J.F., et al. Renaming of the genus flavivirus to orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family flaviviridae. *Arch. Virol.* 2023; 168(9): 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
 21. Zhu Z., Gorman M.J., McKenzie L.D., Chai J.N., Hubert C.G., Prager B.C., et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* 2017; 214(10): 2843–57. <https://doi.org/10.1084/jem.20171093>
 22. Svyatchenko V.A., Razumov I.A., Protopopova E.V., Demina A.M., Solovieva O.I., Zavjalov E.L., et al. Zika virus has an oncolytic activity against human glioblastoma U87 cells. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2019; 22(8): 1040–5. <https://doi.org/10.18699/VJ18.448> <https://elibrary.ru/yqnnul> (in Russian)
 23. Monath T.P., Vasconcelos P.F. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 160–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>
 24. Zhu X., Fan C., Xiong Z., Chen M., Li Z., Tao T., et al. Development and application of oncolytic viruses as the nemesis of tumor cells. *Front. Microbiol.* 2023; 14: 1188526. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188526>
 25. Aznar M.A., Molina C., Teijeira A., Rodriguez I., Azpilikueta A., Garasa S., et al. Repurposing the yellow fever vaccine for intratumoral immunotherapy. *EMBO Mol. Med.* 2020; 12(1): e10375. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910375>
 26. Levkovich E.N., Karpovich L.G. Comparative study of the viruses of the tick encephalitis group in HeLa cell cultures. *Voprosy virusologii*. 1960; (5): 30–9. (in Russian)
 27. Levkovich E.N., Sergeeva G.I. The inhibiting effect of tick-borne encephalitis complex viruses possessing varying neurovirulence on mouse tumors in vivo. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1967; 64(8): 88–91. (in Russian)
 28. Sergeeva G.I., Levkovich E.N. A study of the features of reproduction in tumor cells in vitro and in vivo of different viruses of the tick-borne encephalitis complex, possessing various degrees of neurovirulence. *Voprosy virusologii*. 1966; 11(5): 539–45. (in Russian)
 29. Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., et al. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells. *Biotechnol. J.* 2020; 15(5): 1900217. <https://doi.org/10.1002/biot.201900217>
 30. Dutta S.K., Langenburg T. A perspective on current flavivirus vaccine development: a brief review. *Viruses*. 2023; 15(4): 860. <https://doi.org/10.3390/v15040860>

31. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet*. 2008; 371(9627): 1861–71. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60800-4)
32. Moore A.E. The destructive effect of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. *Cancer*. 1949; 2(3): 525–34. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(194905\)2:3%3C525::aid-cnrcr2820020317%3E3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0142(194905)2:3%3C525::aid-cnrcr2820020317%3E3.0.co;2-o)
33. Moore A.E. Inhibition of growth of five transplantable mouse tumors by the virus of Russian Far East encephalitis. *Cancer*. 1951; 4(2): 375–82. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195103\)4:2%3C375::aid-cnrcr2820040227%3E3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195103)4:2%3C375::aid-cnrcr2820040227%3E3.0.co;2-a)
34. Chiantore M.V., Mangino G., Zangrillo M.S., Iuliano M., Affabris E., Fiorucci G., et al. Role of the Microenvironment in tumourigenesis: focus on virus-induced tumors. *Curr. Med. Chem*. 2015; 22(8): 958–74. <https://doi.org/10.2174/0929867322666141212121751>
35. Gál P., Varinská L., Fáber L., Novák Š., Szabo P., Mitréngová P., et al. How signaling molecules regulate tumor microenvironment: parallels to wound repair. *Molecules*. 2017; 22(11): 1818. <https://doi.org/10.3390/molecules22111818>
36. Lipatova A.V., Soboleva A.V., Gorshkov V.A., Bubis J.A., Solovyeva E.M., Krasnov G.S., et al. Multi-omics analysis of glioblastoma cells' sensitivity to oncolytic viruses. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(21): 5268. <https://doi.org/10.3390/cancers13215268>
37. Moerdyk-Schauwecker M., Shah N.R., Murphy A.M., Hastie E., Mukherjee P., Grdzlishvili V.Z. Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling. *Virology*. 2013; 436(1): 221–34. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.11.014>
38. Sakai T., Mashima H., Yamada Y., Goto T., Sato W., Dohmen T., et al. The roles of interferon regulatory factors 1 and 2 in the progression of human pancreatic cancer. *Pancreas*. 2014; 43(6): 909–16. <https://doi.org/10.1097/mpa.000000000000116>

Информация об авторах:

Назаренко Алина Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: nazarenko_as@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7322-8730>

Бирюкова Юлия Константиновна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: biryukova_jk@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5804-4001>

Орлова Екатерина Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: orlova_ea@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0009-0009-4175-0493>

Трачук Кирилл Николаевич – младший научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: trachuk_kn@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2061-0274>

Иванова Алла Леонидовна – канд. биол. наук, микробиолог отделения энцефалитной вакцины ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: ivanova_al@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0009-0002-3086-0581>

Белякова Алла Владимировна – канд. биол. наук, ученый секретарь ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: belyakova_av@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4363-6394>

Пестов Николай Борисович – канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: pestov_nb@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9973-0120>

Ворович Михаил Фридрихович – канд. биол. наук, заведующий отделением энцефалитной вакцины и ведущий научный сотрудник лаборатории клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: vorovich_mf@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7367-6357>

Ишмухаметов Айдар Айратович – академик РАН, генеральный директор ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: ishmuhametov@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Колясникова Надежда Михайловна – д-р мед. наук, заведующая лабораторией клещевых энцефалитов и других вирусных энцефалитов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия. E-mail: kolyasnikova_nm@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9934-2582>

Участие авторов: Назаренко А.С., Бирюкова Ю.К. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста и графиков; Орлова Е.А. – проведение экспериментов; Трачук К.Н. – оформление, статистический анализ; Иванова А.Л. – проведение экспериментов; Белякова А.В. – оформление, экспертиза на открытие опубликование; Пестов Н.Б., Ворович М.Ф. – концепция и дизайн исследования, анализ данных, проверка предварительного варианта статьи; Ишмухаметов А.А. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Колясникова Н.М. – концепция и дизайн исследования, проверка финальной версии.

Поступила 02.11.2023
Принята в печать 21.12.2023
Опубликована 29.12.2023

Information about the authors:

Alina S. Nazarenko - Junior researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: nazarenko_as@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7322-8730>

Yulia K. Biryukova – Ph. D., Researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 108819, Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: biryukova_jk@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5804-4001>

Ekaterina A. Orlova - Junior researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: orlova_ea@chumakovs.ru; <https://orcid.org/0009-0009-4175-0493>

Kirill N. Trachuk - Junior researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: trachuk_kn@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0002-2061-0274>

Alla L. Ivanova – Ph. D., Microbiologist, Encephalitis Vaccine department, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: ivanova_al@chumakovs.su; <https://orcid.org/0009-0002-3086-0581>

Alla V. Belyakova - Ph. D., Scientific secretary, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: belyakova_av@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0003-4363-6394>

Nikolai B. Pestov - Ph. D., Senior Researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: pestov_nb@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0002-9973-0120>

Mikhail F. Vorovitch – Ph. D., Head of Encephalitis Vaccine Department and Senior Researcher of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: vorovich_mf@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0002-7367-6357>

Aydar A. Ishmukhametov - Academician of the Russian Academy of Sciences, CEO, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: ishmukhametov@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Nadezhda M. Kolyasnikova – D.M.S, Head of the Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: kolyasnikova_nm@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0002-9934-2582>

Contribution: Nazarenko A.S., Biryukova Yu.K. – conception and design of the study, carrying out experiments, collection, analysis and interpretation of data, preparation of text and graphs; Orlova E.A. – carrying out experiments; Trachuk K.N. – design, statistical analysis; Ivanova A.L. – conducting experiments; Belyakova A.V. – design, examination for open publication; Pestov N.B., Vorovich M.F. – concept and design of the study, data analysis, verification of the preliminary version of the article; Ishmukhametov A.A. – approval of the final version of the article for publication; Kolyasnikova N.M. – concept and design of the study, verification of the final version.

Received 02 November 2023

Accepted 21 December 2023

Published 29 December 2023