

ОНКОЛОГИЯ ONCOLOGY

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-LACT В ОТНОШЕНИИ 3D-КУЛЬТУР КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА U-87 MG

Дымова М.А.¹,
Шнайдер Т.А.²,
Чечеткина С.А.³,
Петров Г.О.¹,
Мальшева Д.О.¹,
Дроков Д.В.³,
Агеенко А.Б.¹,
Васильева Н.С.¹,
Рихтер В.А.¹,
Кулигина Е.В.¹

¹ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8, Россия)

² ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10, Россия)

³ ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет» (630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Дымова Майя Александровна,
e-mail: maya.a.rot@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Одним из перспективных методов лечения опухолей является виротерапия, в основе которой лежит прямой лизис вирусом опухолевых клеток и вирус-опосредованный противоопухолевый иммунный ответ организма. Для рекомбинантного штамма вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, продуцирующего GMCSF человека и онкотоксический белок лактаптин, показано цитотоксическое и противоопухолевое действие в экспериментах *in vitro* и *in vivo* соответственно при использовании адгезивных культур клеток U-87 MG глиобластомы человека. 3D-культуры являются более релевантной моделью опухоли в сравнении с адгезивными моделями, так как более полно отражают реалистичный сценарий развития опухолевого процесса, а также ответа опухоли на противоопухолевую терапию.

Цель исследования. Оценка цитотоксического действия онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении клеток 3D-культур глиобластомы человека U-87 MG.

Методы. В работе использовались следующие методы: культивирование 3D-культур клеток; цитофлуориметрия; микроскопический анализ; титрование вируса; статистическая обработка данных.

Результаты. Клетки U-87 MG были трансдуцированы лентивирусным вектором, несущим ген GFP. Цитотоксичность вируса VV-GMCSF-Lact (IC50) в отношении исследуемых клеток составила 0,024 БОЕ/клетку. Далее клетки U-87 MG культивировали в условиях формирования 3D-структур. С помощью микроскопического анализа показано онколитическое действие вируса на клетки 3D-культур уже спустя 24 часа после начала инкубации. Методом проточной цитофлуориметрии показано увеличение гранулярности клеток глиобластомы под действием вируса, что указывает на активную репликацию вируса в клетках. Титр вируса составил 0,44 БОЕ/клетку.

Заключение. Рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact оказывает цитотоксическое действие на 3D-культуры клеток глиобластомы человека U-87 MG, активно реплицируется в них. В дальнейшем для тестирования онколитического действия VV-GMCSF-Lact планируется использовать не только 3D-культуры глиобластомы человека, но и церебральные органоиды, полученные в процессе сокультивирования клеток глиобластомы и индуцированных плюрипотентных клеток человека.

Ключевые слова: глиобластома, нейросферы, онколитический вирус, VV-GMCSF-Lact

Для цитирования: Дымова М.А., Шнайдер Т.А., Чечеткина С.А., Петров Г.О., Мальшева Д.О., Дроков Д.В., Агеенко А.Б., Васильева Н.С., Рихтер В.А., Кулигина Е.В. Цитотоксическое действие онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении 3D-культур клеток глиобластомы человека U-87 MG. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(6): 162-169. doi: 10.29413/ABS.2023-8.6.15

Статья поступила: 29.08.2023

Статья принята: 29.11.2023

Статья опубликована: 29.12.2023

CYTOTOXIC EFFECT OF THE VV-GMCSF-LACT ONCOLYTIC VIRUS AGAINST 3D CULTURES OF HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS U-87 MG

Dymova M.A.¹,
Shnaider T.A.²,
Chechetkina S.A.³,
Petrov G.O.¹,
Malysheva D.O.¹,
Drokov D.V.³,
Ageenko A.B.¹,
Vasileva N.S.¹,
Richter V.A.¹,
Kuligina E.V.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Akademika Lavrentieva Ave. 8, Novosibirsk 630090, Russian Federation)

² Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Akademika Lavrentieva Ave. 10, Novosibirsk 630090, Russian Federation)

³ Novosibirsk State University (Pirogova str. 2, Novosibirsk 630090, Russian Federation)

Corresponding author:
Maya A. Dymova,
e-mail: maya.a.rot@gmail.com

ABSTRACT

Background. One of the promising methods of treating tumors is virotherapy, which is based on direct lysis of cancer cells by a virus and a virus-mediated anti-tumor immune response of the body. For the recombinant vaccinia virus strain VV-GMCSF-Lact, producing human GMCSF and the oncotoxic protein lactaptin, cytotoxic and antitumor effects were shown in experiments in vitro and in vivo, respectively, when using adhesive cultures of U-87 MG human glioblastoma cells. 3D cultures are a more relevant tumor model than adhesive models, as they more fully reflect the realistic scenario of cancer development, as well as the response of the tumor to anticancer therapy.

The aim. To evaluate the cytotoxic effect of the oncolytic virus VV-GMCSF-Lact against 3D cultures of human glioblastoma U-87 MG.

Materials and methods. The following methods were used in the work: cultivation of 3D cell cultures, cytofluorometry, microscopic analysis, virus titration, statistical analysis.

Results. U-87 MG cells were transduced with a lentiviral vector carrying the GFP reporter gene. The cytotoxicity of the VV-GMCSF-Lact virus (IC50) against the studied cells was 0.024 PFU/cell. U-87 MG cells were cultured under conditions for the formation of 3D structures. Microscopic analysis showed the oncolytic effect of the virus on the cells of 3D cultures as early as 24 hours after the start of incubation. Flow cytometry showed an increase in the granularity of glioblastoma cells under the action of the virus, which indicates active replication of the virus in the cells. The virus titer was 0.44 PFU/cell.

Conclusions. The recombinant VV-GMCSF-Lact virus has a cytotoxic effect on 3D human glioblastoma U-87 MG cell cultures and actively replicates in them. In the future, to test the oncolytic effect of VV-GMCSF-Lact, it is planned to use not only 3D human glioblastoma cultures, but also cerebral organelles obtained in the process of cocultivation of glioblastoma cells and induced human pluripotent cells.

Key words: glioblastoma, neurospheres, oncolytic virus, VV-GMCSF-Lact

Received: 29.08.2023
Accepted: 29.11.2023
Published: 29.12.2023

For citation: Dymova M.A., Shnaider T.A., Chechetkina S.A., Petrov G.O., Malysheva D.O., Drokov D.V., Ageenko A.B., Vasileva N.S., Richter V.A., Kuligina E.V. Cytotoxic effect of the VV-GMCSF-Lact oncolytic virus against 3D cultures of human glioblastoma cells U-87 MG. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(6): 162-169. doi: 10.29413/ABS.2023-8.6.15

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома (ГБМ) человека или астроцитомы IV степени злокачественности – одна из самых распространённых видов злокачественных первичных опухолей мозга, характеризующаяся высокой инвазивностью, гетерогенностью и агрессивностью протекания опухолевого процесса. При традиционной схеме лечения (стандартной терапией ГБМ является протокол Ступпа), включающей хирургическую резекцию, радио- и химиотерапию темозоломидом, выживаемость пациентов с диагнозом глиобластома составляет всего лишь 26,5 %, общая выживаемость более 10 лет – 0,71 % [1]. Действительно, средняя продолжительность жизни после постановки диагноза составляет около 15 месяцев, при этом в отсутствие терапии выживаемость обычно составляет не более 3 месяцев. Заболевание чаще встречается у мужчин, нежели у женщин, и средний возраст больных на момент постановки диагноза составляет 64 года. Поэтому разработка новых терапевтических подходов для таких трудноизлечимых онкологических заболеваний крайне необходима. Одним из перспективных методов лечения опухолей является виротерапия, основой которой является прямой лизис вирусом опухолевых клеток и вирус-опосредованный противоопухолевый иммунный ответ организма. Противоопухолевая эффективность рекомбинантных вирусов может быть усилена за счёт встройки в их геном генов онкотоксических и иммуномодулирующих белков.

В данной работе был использован рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, продуцирующий гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор человека (GMCSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) и онкотоксический белок лактаптин [2]. Ранее был показан противоопухолевый эффект VV-GMCSF-Lact в отношении рака молочной железы, и в настоящее время проводятся его клинические испытания (ClinicalTrials.gov: NCT05376527). Однако спектр действия данного вируса гораздо шире: в частности, было показано его цитотоксическое и противоопухолевое действие в экспериментах *in vitro* и *in vivo* соответственно при использовании адгезивных культур глиобластомы человека U-87 MG [3]. Известно, что 3D-культуры являются более релевантной моделью опухоли, так как позволяют более полно воспроизвести сценарий развития опухолевого процесса, а также ответ на противоопухолевую терапию.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценка онколитического действия VV-GMCSF-Lact в отношении клеток 3D-культур глиобластомы человека U-87 MG. Для большей визуализации цитотоксического эффекта рекомбинантного вируса в данной работе мы использовали клетки глиобластомы человека U-87 MG, предварительно трансдуцированные лентивирусом, несущим репортерный ген *GFP*.

МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Клетки линии U-87, трансдуцированные лентивирусом, несущим ген *GFP*, культивировали в полной ростовой среде DMEM/F12 с добавлением 10%-й фетальной бычьей сыворотки (FBS, fetal bovine serum), 2 mM L-глутамина, 1X раствора незаменимых аминокислот MEM и раствора антибиотика (100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата) при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Для получения сфероидов микролуночные планшеты AggreWell™800 (STEMCELL Technologies, Канада) обрабатывали Anti-Adherence Rinsing Solution (STEMCELL Technologies, Канада) в течение 10 минут, после чего промывали 1X PBS. Клетки диссоциировали с помощью 0,25%-го раствора трипсина с EDTA и рассаживали в количестве 3 × 10⁶ клеток на лунку в 2 мл ростовой среды. На следующий день меняли половину объёма среды. На третий день сфероиды вымывали из микролунок и переносили в 10 см чашки и культивировали в шейкере-инкубаторе при 37 °C, 5 % CO₂ и постоянной агитации на 80 об/мин, каждые 3–4 дня проводили смену среды.

Определение цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток U-87 MG

Клетки U-87 MG рассаживали на 96-луночный планшет в количестве 4 × 10³ клеток на лунку в 100 мкл среды Opti-MEM без содержания фенолового-красного и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Через 24 ч к клеткам добавляли VV-GMCSF-Lact. Множественность инфекции вируса варьировали от 0,0012 до 10 БОЕ на клетку. Клетки инкубировали с вирусом в течение 72 ч. Контрольные клетки инкубировали в тех же условиях без добавления вирусного препарата. После инкубации в лунки добавляли по 10 мкл реагента из набора Deep Blue Viability Kit (BioLegend, США) и инкубировали в течение 4 часов при 37 °C. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 570 нм (референсное значение – 620 нм) на спектрофотометре Apollo LB 912 (Berthold Technologies, Германия). Жизнеспособность клеток определяли относительно жизнеспособности контрольных клеток (100 %) ± SD по результатам трёх независимых экспериментов.

Определение цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток 3D-культур глиобластомы человека U-87 MG

3D-культуры клеток U-87 MG помещали в лунки 96-луночного планшета по 10 штук в лунку и культивировали в 100 мкл полной культуральной среды DMEM/F12. Через 24 ч среду удаляли и заменяли на 50 мкл вирусной суспензии с титром вируса 3,3 × 10⁷ БОЕ/мл. В контрольные лунки добавляли 50 мкл 1 mM TRIS HCl (pH = 8,5). Для осаждения вируса планшет центрифугировали в течение 20 мин при 500 об/мин. Далее клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C в течение 20 мин, после чего добавляли 50 мкл полной культуральной среды DMEM/F12. Цитотоксическое действие вируса анализировали через 24 и 72 часа и на 7-е сутки после инфицирования клеток.

Микроскопия

Образцы 3D-культур клеток после воздействия вируса анализировали прижизненно, в проходящем свете и в зелёном канале FITC с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti (г. Токио, Япония).

Цитофлуориметрический анализ

Образцы клеток после воздействия вируса были диссоциированы ферментативно с помощью реагента Accutax (Stemcell Technologies, Канада) и проанализированы на проточном цитометре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием набора BD Pharmigen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, согласно инструкции производителя с небольшими модификациями: использовали только один краситель – пропидий йодид (PI), так как Annexin V – FITC необходимо анализировать в зелёном канале, уже занятом в связи с проведённой трансдукцией клеток U-87 MG. Результаты цитофлуориметрии анализировали в FlowJo™ v. 10 Software (Becton Dickinson, США).

Титрование вируса VV-GMCSF-Lact

Клетки почки зелёной мартышки 4647 рассаживали в 12-луночный планшет по 300 тыс. клеток на лунку, в 2 мл полной среды DMEM с 10%-й эмбриональной сывороткой (FBS) и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ до образования 90%-го монослоя. Готовили 10-кратные разведения вирусной суспензии в среде DMEM. Удаляли ростовую среду из лунок планшета и добавляли в центр каждой лунки по 100 мкл соответствующего разведения вируса. Планшет с клетками инкубировали при 37 °C в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа. Затем добавляли в лунки по 2 мл поддерживающей среды (DMEM + 2 % FBS) и оставляли планшет при 37 °C в CO₂ инкубаторе на 48 часов. Далее удаляли поддерживающую среду, добавляли в лунки с клетками по 1 мл раствора кристаллического фиолетового и оставляли на 20 мин при комнатной температуре. Затем раствор кристаллического фиолетового удаляли и считали бляшки.

Статистический анализ

Количественные переменные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD, standard deviation). Каждый эксперимент повторяли не менее трёх раз. Статистический анализ проводился с использованием GraphPad 6.01 (GraphPad Software, США). Двухфакторный дисперсионный анализ использовался для сравнения более чем двух наборов данных. Различия считались статистически значимыми, если значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки глиобластомы человека U-87 MG были трансдуцированы лентивирусной конструкцией, несущей репортерный ген *GFP*, так как в последующем планируется использовать данные клетки для сокультивирования с церебральными органоидами человека. Цитотоксичность вируса в отношении клеток U-87 MG определяли

по пролиферативной активности клеток с использованием резазурина в качестве индикатора. Степень снижения резазурина и продукции резорурфина пропорциональна количеству метаболически активных клеток (живых клеток), присутствующих в культуре. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀, half maximal inhibitory concentration), вычисленное в программе CompuSyn, составило 0,024 БОЕ/клетку, что говорит о более высокой чувствительности данной клеточной культуры к вирусу VV-GMCSF-Lact по сравнению с нетрансдуцированной лентивирусом культурой клеток U-87 MG [4].

Сформированные 3D-культуры U-87 MG инкубировали с VV-GMCSF-Lact, титр которого составлял $3,3 \times 10^7$ БОЕ/мл. Данное количество вирусных частиц сопоставимо с таковым при внутриопухолевом введении в организм лабораторного животного в доклинических испытаниях [3]. Дальнейший анализ клеток 3D-культур проводили спустя 24 и 72 ч и 7 дней после инфицирования клеток. Показано, что репликация некоторых онколитических вирусов может увеличиваться уже спустя 24 ч после заражения опухолевых клеток, однако после 72 ч она начинает снижаться [5, 6].

Микроскопический анализ образцов проводили как в проходящем свете, так и с использованием флуоресцентного фильтра для флуоресценции изотиоцианата (FITC, fluorescein isothiocyanate). Нами было показано онколитическое действие VV-GMCSF-Lact на 3D-культуры клеток U-87 MG (рис. 1).

С увеличением времени инкубации с вирусом структура 3D-культур разрушается и количество клеточного дебриса увеличивается («3D-культуры с вирусом_24 часа», «3D-культуры с вирусом_72 часа», «3D-культуры с вирусом_7 дней»), тогда как в контрольных лунках 3D-культуры («Контрольные 3D-культуры_24 часа», «Контрольные 3D-культуры_72 часа», «Контрольные 3D-культуры_7 дней») не изменяются, сохраняя чёткие очертания и ровные края. Интенсивность реакций клеточной гибели оценивали по взаимодействию клеток с пропидий йодидом (PI), маркером некроза. К сожалению, возможно, из-за наличия некротического ядра внутри 3D культур статистически значимой разницы между группами в количестве окрашенных клеток в канале PE не наблюдалось. Известно, что при достижении опухолевым сфероидом диаметра более 500 мкм, в сфероиде обычно наблюдается трёхслойная концентрическая структура, включающая внешний слой пролиферирующих клеток, средний слой покоящихся клеток и центральную некротическую зону, при этом каждая область находится на разных стадиях клеточного цикла [7]. Сложность этой многослойной структуры может быть вызвана недостатком кислорода и питательных веществ, что не наблюдается в 2D-культурах опухолевых клеток. Известно, что лекарственные препараты, растворимые метаболиты, а также концентрация кислорода и pH существуют в виде градиента внутри опухоли: периферические клетки, находящиеся ближе к кровеносным сосудам, имеют больший доступ к растворимым компонентам и кислороду, который уменьшает-

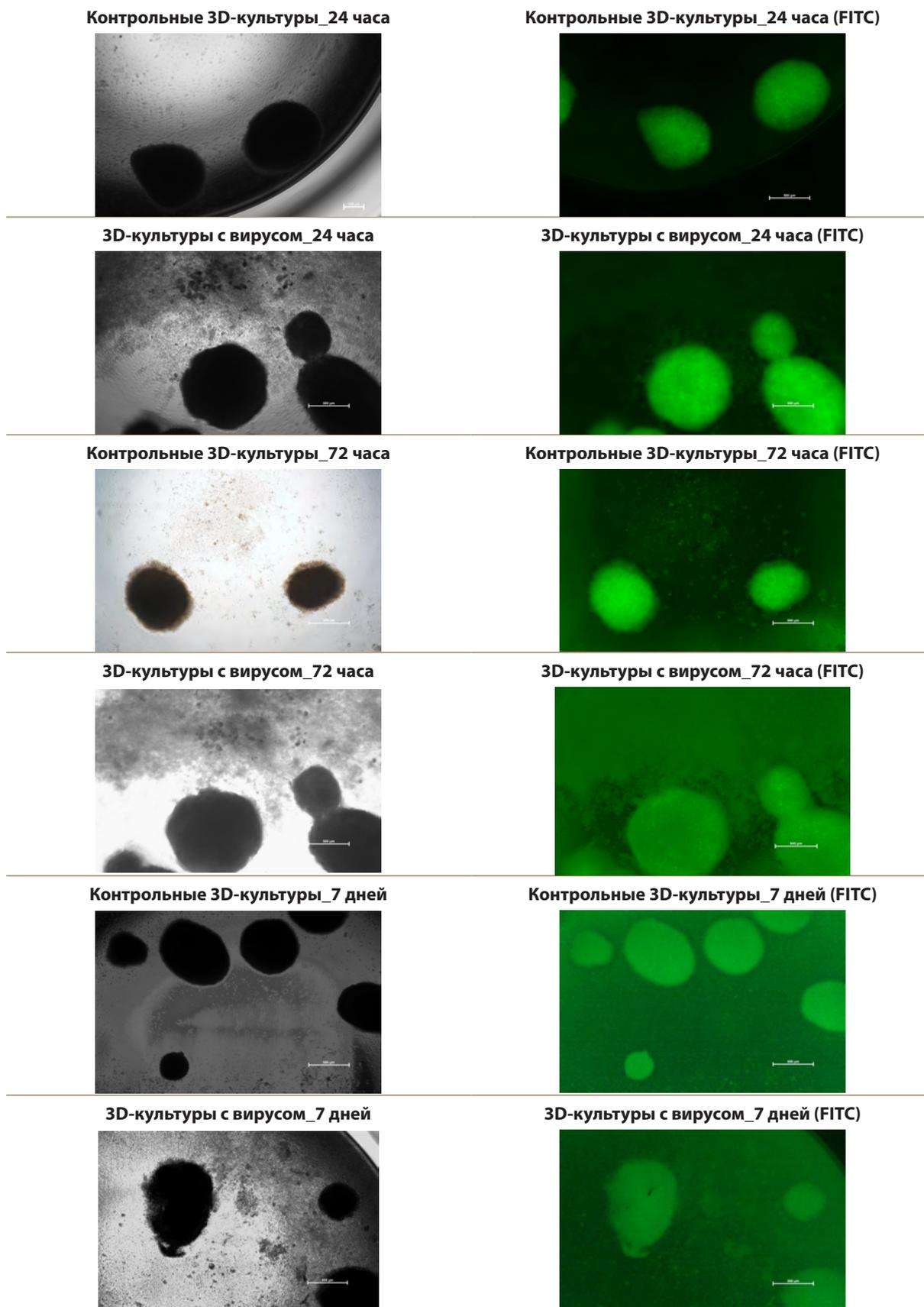


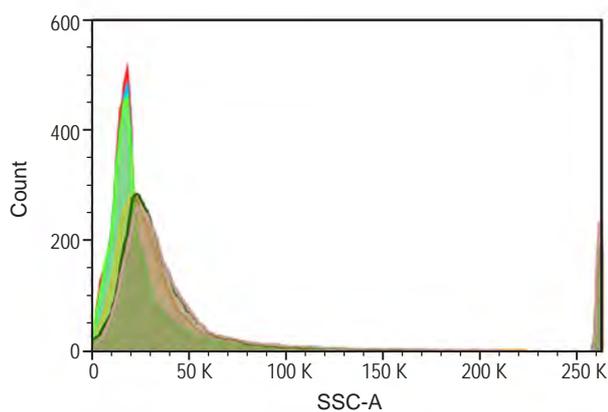
РИС. 1.
Микроскопическое изображение клеток 3D-культур, обработанных онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact, и необработанных контрольных клеток 3D-культур; увеличение микроскопа $\times 40$

FIG. 1.
Microscopic image of 3D culture cells treated with VV-GMCSF-Lact and untreated control 3D culture cells; microscope magnification $\times 40$

ся по мере его диффузии через внеклеточный матрикс к ядру опухоли. Градиенты концентрации факторов роста, питательных веществ, метаболитов создают внутриопухолевую гетерогенность и влияют на передачу сигналов в микроокружении, включая функцию клеток, пролиферацию, морфогенез и хемотаксис [8]. С точки зрения фармакокинетики градиент концентрации ограничивает проникновение лекарств в опухоль и достижения дозировки, достаточной для оказания терапевтического воздействия на все раковые клетки.

С использованием цитофлуориметрического анализа нами показано статистически значимое увеличение интенсивности бокового светорассеивания, то есть гранулярности клеток 3D-культур во временных точках 24 и 72 ч (рис. 2), что косвенно указывает на активную репликацию вируса в клетках. Так, ранее было показано, что популяции клеток с более высокой интенсивностью бокового светорассеивания (SSC, side scatter) имели больше включений, больше органелл и виросом (вирусных фабрик) [9, 10].

Для оценки эффективности репликации VV-GMCSF-Lact в клетках 3D-культур глиобластомы человека был определён титр вируса на 7-й день после инфицирования клеток [11]. Показано, что вирус эффективно реплицируется в клетках сфероидов; титр составил 0,44 БОЕ/клетку, что в ≈ 18 раз превышает IC50 для соответствующих адгезивных культур, что ещё раз подтверждает литературные данные о резистентности 3D-культур по сравнению с адгезивными клетками при тестировании цитотоксичности противоопухолевых препаратов [12]. Скорее всего, репликация вируса происходит во внешнем клеточном слое сфероида, однако для точного выявления локализации этого процесса необходимо провести дополнительные эксперименты.



а

РИС. 2.

а – распределение клеток 3D-культур по интенсивности бокового светорассеивания; проточная цитометрия. **б** – средняя интенсивность бокового светорассеивания клеток 3D-культур, обработанных вирусом (в_24 ч, в_72 ч, в_7 д) по сравнению с клетками контрольной группы (к_24 ч, к_72 ч, к_7 д)

Таким образом, клетки, культивируемые в более крупных трёхмерных агрегатах, имитируют состояние *in vivo*, находясь в различных пролиферативных состояниях, основанных на доступе к питательным веществам, который ограничен градиентом концентрации. И хотя 2D-культуры по-прежнему преимущественно используются для разработки лекарственных средств из-за своей простоты и совместимости с платформами скрининга, системы 3D-культуры имеют многочисленные преимущества по сравнению с 2D-культурой клеток. Так, 3D-модели культуры клеток более точно отражают патофизиологическую среду, позволяющую опухолевым клеткам агрегировать, размножаться и проявлять фенотипы, как они это делают внутри организма [13]. Сложные клеточные взаимодействия между другими клетками и трёхмерной матрицей имеют решающее значение для поддержания структуры, функции и подвижности опухолевых клеток. Поскольку миграция клеток происходит в трёх измерениях, матрица обеспечивает топологию, имитирующую трёхмерную архитектуру ткани, позволяя клеткам прикрепляться и взаимодействовать с окружающей средой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3D-культуры являются более релевантной моделью для тестирования противоопухолевых препаратов в сравнении с адгезивными моделями. Более того, переход к 3D-доклиническим моделям стал более привлекательным, поскольку совершенствование технологий тканевой инженерии сделало 3D-культуру клеток более адаптируемой и настраиваемой в зависимости от факторов микроокружения, чтобы лучше отражать функциональную па-

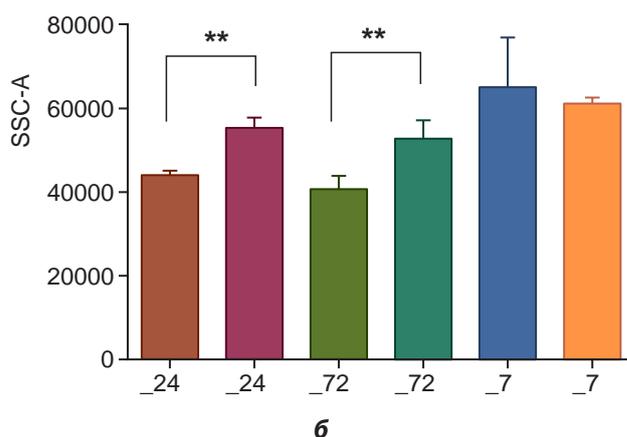


FIG. 2.

а – distribution of cells in 3D cultures by the intensity of side scattering; flow cytometry. **б** – the average intensity of side scattering of cells in 3D cultures treated with the virus (v_24 ч, v_72 ч, v_7 д) compared to the cells of the control group (к_24 ч, к_72 ч, к_7 д)

тологию опухолей *in vivo*. Использование 3D-культур позволяет в том числе оценить способность онколитических препаратов проникать в опухоль и воздействовать на её внутренние структуры. В то же время формирование неклеточного ядра опухоли затрудняет анализ онколитического действия вируса с помощью цитометрии. Таким образом, необходимо использовать несколько аналитических методов для оценки противоопухолевой эффективности терапевтических препаратов.

В дальнейшем для тестирования цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact планируется использовать не только 3D-культуры глиобластомы человека, но и химерные церебральные органоиды, полученные в процессе сокультивирования опухолевых клеток и церебральных органоидов человека [14]. Такая клеточная модель позволяет воссоздать трёхмерную цитоархитектонику некоторых отделов мозга, что открывает уникальные возможности исследования взаимодействия опухолевых клеток и клеток головного мозга, а также влияния онколитического препарата на здоровую нервную ткань и микроокружение глиальной опухоли [15].

Финансирование

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-64-00041 (https://rscf.ru/prjcard_int?22-64-00041).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tykocki T, Eltayeb M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *J Clin Neurosci*. 2018; 54: 7-13. doi: 10.1016/j.jocn.2018.05.002
2. Koval O, Kochneva G, Tkachenko A, Troitskaya O, Sivolobova G, Grazhdantseva A, et al. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 3620510. doi: 10.1155/2017/3620510
3. Vasileva N, Ageenko A, Dmitrieva M, Nushtaeva A, Mishinov S, Kochneva G, et al. Double recombinant vaccinia virus: A candidate drug against human glioblastoma. *Life (Basel)*. 2021; 11(10): 1084. doi: 10.3390/life11101084
4. Vasileva NS, Ageenko AB, Richter VA, Kuligina EV. The signaling pathways controlling the efficacy of glioblastoma therapy. *Acta Naturae*. 2022; 14(2): 62-70. doi: 10.32607/actanaturae.11623
5. Banijamali RS, Soleimanjahi H, Soudi S, Karimi H, Abdoli A, Seyed Khorrami SM, et al. Kinetics of oncolytic reovirus T3D replication and growth pattern in mesenchymal stem cells. *Cell J*. 2020; 22(3): 283-292. doi: 10.22074/cellj.2020.6686
6. O'Leary MP, Warner SG, Kim SI, Chaurasiya S, Lu J, Choi AH, et al. A novel oncolytic chimeric orthopoxvirus encoding luciferase enables real-time view of colorectal cancer cell infection. *Mol Ther Oncolytics*. 2018; 9: 13-21. doi: 10.1016/j.omto.2018.03.001
7. Huang Y, Wang S, Guo Q, Kessel S, Rubinoff I, Chan LL, et al. Optical coherence tomography detects necrotic regions and volumetrically quantifies multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 2017; 77(21): 6011-6020. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0821
8. Langhans SA. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 6. doi: 10.3389/fphar.2018.00006
9. Xin X, Wang H, Han L, Wang M, Fang H, Hao Y, et al. Single-cell analysis of the impact of host cell heterogeneity on infection with foot-and-mouth disease virus. *J Virol*. 2018; 92(9): e00179-18. doi: 10.1128/JVI.00179-18
10. Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C. Virus factories: Associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell*. 2005; 97(2): 147-172. doi: 10.1042/BC20040058
11. Kochneva G, Sivolobova G, Tkacheva A, Grazhdantseva A, Troitskaya O, Nushtaeva A. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7(45): 74171-74188. doi: 10.18632/oncotarget.12367
12. Law AMK, Rodriguez de la Fuente L, Grundy TJ, Fang G, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D. Advancements in 3D cell culture systems for personalizing anti-cancer therapies. *Front Oncol*. 2021; 11: 782766. doi: 10.3389/fonc.2021.782766
13. Gjorevski N, Piotrowski AS, Varner VD, Nelson CM. Dynamic tensile forces drive collective cell migration through three-dimensional extracellular matrices. *Sci Rep*. 2015; 5: 11458. doi: 10.1038/srep11458
14. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013; 501(7467): 373-379. doi: 10.1038/nature12517
15. Ogawa J, Pao GM, Shokhirev MN, Verma IM. Glioblastoma model using human cerebral organoids. *Cell Rep*. 2018; 23(4): 1220-1229. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.105

Сведения об авторах

Дымова Майя Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, e-mail: maya.a.rot@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7281-9096>

Шнайдер Татьяна Александровна – младший научный сотрудник сектора геномных механизмов онтогенеза, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: shnyder.t@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7452-8372>

Четёткина Софья Александровна – студентка, ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет», e-mail: s.tschetschekina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0656-5806>

Петров Глеб Олегович – старший лаборант лаборатории биотехнологии, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, e-mail: petrov.olegovich@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2924-5920>

Малышева Дарья Олеговна – лаборант лаборатории биотехнологии, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, e-mail: d.malysheva@gsu.nsu.ru, <https://orcid.org/0009-0005-1210-1815>

Дроков Данил Валерьевич – студент, ФГАОУ ВО «Новосибирский государственный университет», e-mail: d.drokov@gsu.nsu.ru, <https://orcid.org/0009-0001-7343-4438>

Агеенко Алиса Борисовна – инженер первой категории лаборатории биотехнологии, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, e-mail: a.ageenko@alumni.nsu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6909-7301>

Васильева Наталья Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории геномного редактирования, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, e-mail: nataly_vas@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0392-794X>

Рихтер Владимир Александрович – заведующий лабораторией биотехнологии, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, e-mail: richter@niboch.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5849-5892>

Кулигина Елена Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, e-mail: kuligina@niboch.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3145-1878>

Information about the authors

Maya A. Dymova – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Biotechnology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: maya.a.rot@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7281-9096>

Tatyana A. Shnaider – Junior Research Officer at the Department of Genomic Mechanisms of Ontogenesis, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: shnayder.t@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7452-8372>

Sophia A. Chechetkina – student, Novosibirsk State University, e-mail: s.tschetschetkina@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0656-5806>

Gleb O. Petrov – Senior Clinical Research Assistant at the Laboratory of Biotechnology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: petrov.olegovich@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2924-5920>

Daria O. Malysheva – Clinical Research Assistant at the Laboratory of Biotechnology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: d.malysheva@g.nsu.ru, <https://orcid.org/0009-0005-1210-1815>

Danil V. Drovkov – student, Novosibirsk State University, e-mail: d.drovkov@g.nsu.ru, <https://orcid.org/0009-0001-7343-4438>

Alisa B. Ageenko – Engineer of the First Category at the Laboratory of Biotechnology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: a.ageenko@alumni.nsu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6909-7301>

Natalia S. Vasileva – Junior Research Officer at the Laboratory of Genomic Editing, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: nataly_vas@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0392-794X>

Vladimir A. Richter – Head of the Laboratory of Biotechnology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: richter@niboch.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5849-5892>

Elena V. Kuligina – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Biotechnology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: kuligina@niboch.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3145-1878>

Статья опубликована в рамках IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Развитие физико-химической биологии, биотехнологии и биоинформатики на современном этапе».