

Для цитирования: Вязовая Е.А., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д. Индукция апоптоза клеток меланомы В16 при воздействии препарата фактора некроза опухолей альфа в составе вирусоподобных частиц *in vitro*. Сибирский онкологический журнал. 2020; 19(4): 99–104. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-4-99-104.

For citation: Vyazovaya E.A., Lebedev L.R., Danilenko E.D. Induction of apoptosis in B16 melanoma cells under the action of drug containing tumor necrosis factor alpha as a part of virus-like particles *in vitro*. Siberian Journal of Oncology. 2020; 19(4): 99–104. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-4-99-104.

ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ В16 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА В СОСТАВЕ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ *IN VITRO*

Е.А. Вязовая, Л.Р. Лебедев, Е.Д. Даниленко

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия
Россия, 633010, г. Бердск, ул. Химзаводская, 9. E-mail: viazovaia@mail.ru

Аннотация

Цель исследования – оценка противоопухолевой активности препарата, содержащего фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) и двуспиральную рибонуклеиновую кислоту (дсРНК) в составе молекулярной конструкции («вирусоподобной частицы») (ВПЧ-ФНО-альфа), на клетках меланомы В16-F10. **Материал и методы.** Анализ антипролиферативного действия ВПЧ-ФНО-альфа и его компонентов ФНО-альфа и dsРНК проводили с помощью МТТ-теста, апоптоз клеток меланомы оценивали методом проточной цитофлуориметрии с ФИТЦ-аннексином V. **Результаты.** Показано, что токсическое воздействие препарата, содержащего ФНО-альфа и dsРНК в составе вирусоподобных частиц, на клетки меланомы значительно превышает суммарный токсический эффект ФНО-альфа и dsРНК в отдельности (ЛД50 составляет, соответственно, для комплексного препарата 0,05 мкг/мл, ФНО-альфа – 9,5 мкг/мл, dsРНК >20 мкг/мл). **Заключение.** Препарат, содержащий ФНО-альфа и dsРНК в молекулярной конструкции, может быть многообещающим терапевтическим средством для лечения злокачественных новообразований, включая меланому.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей альфа, двуспиральная РНК, вирусоподобная частица, ВПЧ-ФНО-альфа, апоптоз, антипролиферативное действие, меланома.

INDUCTION OF APOPTOSIS IN B16 MELANOMA CELLS UNDER THE ACTION OF DRUG CONTAINING TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AS A PART OF VIRUS-LIKE PARTICLES *IN VITRO*

Е.А. Vyazovaya, L.R. Lebedev, E.D. Danilenko

Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»,
Berdsk, Russia
9, Khimzavodskaya Street, 633010-Berdsk, Russia. E-mail: viazovaia@mail.ru

Abstract

Aim: to evaluate the antitumor activity of the drug containing TNF-alpha and high-polymer double-stranded RNA (dsRNA) in the composition of virus-like particles (VLP-TNF-alpha) on B16-F10 melanoma cells. **Material and Methods.** Analysis of the anti-proliferative effect of VLP-TNF-alpha as well as its components, TNF-alpha and dsRNA, was carried out using the MTT-test. Apoptosis of melanoma cells was assessed by flow cytofluorimetry with FITC-annexin V. **Results.** It was shown that the cytotoxic effect of the drug containing the combination of TNF-alpha and dsRNA on melanoma cells significantly exceeded the total cytotoxic effect of TNF-alpha or dsRNA alone (LD50 for combination drug was 0.05 µg/ml, TNF-alpha – 9.5 µg/ml, dsRNA >20 µg/ml).

µg/ml). **Conclusion.** The drug containing TNF-alpha and dsRNA molecules may be a promising drug for the treatment of malignant tumors, including melanoma.

Key words: tumor necrosis factor alpha, double-stranded RNA, virus-like particle, VLP-TNF-alpha, apoptosis, antiproliferative activity, melanoma.

Введение

Неконтролируемый рост и устойчивость к апоптозу являются двумя важнейшими признаками возникновения злокачественных новообразований (ЗНО), а также прогрессирования онкологического процесса. Следовательно, методы лечения, нацеленные на эти механизмы элиминации трансформированных клеток, могут быть идеальными способами лечения рака. Кроме того, индукция апоптоза может быть более действенной терапией по сравнению с ингибированием пролиферации, поскольку она способна полностью устранить опухолевые клетки. По мере накопления знаний о механизмах клеточной гибели появляются новые идеи и методы борьбы со злокачественными клетками. Комплексное воздействие на опухоль, обеспечивающее активацию противоопухолевого иммунного ответа и апоптоза клеток опухоли, — одно из перспективных направлений в современной онкологии [1].

Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа, TNF-alpha) в течение многих лет привлекает внимание исследователей, фармакологов и клиницистов как потенциальное противоопухолевое средство, что связано с его многофакторным воздействием на опухоль: избирательной способностью тормозить рост и вызывать лизис злокачественных клеток, вызывать геморрагический некроз опухолей, активировать иммунный противоопухолевый ответ [2]. Однако в ходе системного введения ФНО-альфа выявлены его нестабильность в кровеносном русле, широкий спектр побочных эффектов, а также недостаточная селективность накопления в опухолевых клетках [3].

Среди разнообразных методических приемов, которые используются в настоящее время для решения этого комплекса проблем, можно выделить подход, направленный на создание средств адресной доставки ФНО-альфа к клеткам-мишеням [4, 5]. Одной из таких разработок является оригинальная молекулярная конструкция для депонирования белка с целью защиты от протеаз и транспортировки к клеткам-мишеням [6]. Средство адресной доставки представляет собой так называемую вирусоподобную частицу (ВПЧ), ядро которой образовано двуспиральными РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и окружено полисахаридной оболочкой с экспонированными на ее поверхности молекулами белка. Достоинство конструкции состоит в ее биодegradуемости и наличии биологической активности у всех ее компонентов.

Активным компонентом молекулярной конструкции, помимо рекомбинантного ФНО-альфа человека, является двуспиральная дрожжевая РНК.

Известно, что dsРНК способны усиливать продукцию интерферона (ИФН) 1 типа, который обладает свойством индуцировать апоптоз в нормальных и опухолевых клетках [7, 8]. Важно отметить, что в некоторых трансформированных клетках человека и мыши, включая клетки меланомы В16-F10, были обнаружены мРНК, необходимые для синтеза ИФН [9, 10].

Препарат ВПЧ-ФНО-альфа отличается повышенной по сравнению с ФНО-альфа противоопухолевой активностью, а также тропностью к ткани опухоли и коже [6, 11], что открывает интересные перспективы его применения для лечения злокачественных новообразований, включая меланому.

Целью исследования явилась оценка прямого токсического действия препарата ВПЧ-ФНО-альфа и его компонентов на клетки меланомы В16-F10.

Материал и методы

В работе использовали препараты производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»: двуспиральную РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, полученную по ранее описанной методике [12]; рекомбинантный человеческий фактор некроза опухоли альфа с активностью 8×10^7 МЕ/мг [13]; препарат ВПЧ-ФНО-альфа с концентрацией белка 0,16 мг/мл и специфической цитолитической активностью $1,9 \times 10^7$ МЕ/мг [6]. Клеточная линия меланомы В16 клон F10 получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург.

MTT-тест

Токсическое (антипролиферативное) действие изучаемых препаратов оценивали с помощью МТТ-теста [14]. Клетки меланомы В16-F10 помещали по 10^4 /лунку в 96-луночный микропланшет (TPP, Швейцария) в полной среде DMEM (Биолот) с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone, США) и 0,04 мг/мл гентамицина. Через сутки в лунки вносили ФНО-альфа, dsРНК или ВПЧ-ФНО-альфа в убывающих концентрациях, каждое разведение исследовали в 6 повторах, в контрольные лунки вносили физиологический раствор. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе (SHEL-LAB, США) при температуре 37 °С в течение 72 ч, затем измеряли оптическую плотность восстановленного МТТ-реagenta (Sigma – Aldrich) на ридере Multiskan EX (Thermo, Финляндия) при длине волны 540 нм. Поскольку восстановление 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил тетразолиум бромид (МТТ) возможно только в метаболически активных клетках, оптическая плотность в каждой лунке планшета соответствовала коли-

честву живых клеток, и по соотношению оптической плотности опытных и контрольных лунок рассчитывали процент живых клеток для каждого разведения исследуемых препаратов (индекс $MTT = O/K \times 100$). Экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ «Statgraphics, Vers.5.0». Для оценки значимости межгрупповых различий использовали U-критерий Манна – Уитни, критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Метод изучения апоптоза опухолевых клеток

Анализ механизма цитотоксического действия препаратов проводили методом выявления специфического молекулярного маркера фосфатидилсерина на клеточной мембране гибнущих клеток-мишеней меланомы B16-F10 с помощью проточной цитофлуориметрии. Исследование проводили с помощью диагностического набора для цитофлуориметрической оценки апоптоза «FITC Annexin V Detection Kit 1» (BD Pharmingen, США). Для определения апоптотических изменений в плазматической мембране клетки меланомы помещали в 24-луночный планшет (TPP, Швейцария) по 10^6 клеток/лунку в объеме 1 мл полной среды, куда вносили растворы ВПЧ-ФНО-альфа, ФНО-альфа или дсРНК в конечных концентрациях, выбранных на основании MTT-теста. Планшеты инкубировали в CO_2 -инкубаторе при температуре 37 °C в атмосфере с 5 % CO_2 в течение 48 ч. Затем клетки снимали с подложки смесью трипсин-версен (ПанЭко), окрашивали согласно инструкции к диагностическому набору и проводили анализ на цитофлуориметре BD FACS Aria (BD Pharmingen, США) с помощью пакета программ BD FACS DiVa. Определяли соотношение количества клеток в раннем и позднем апоптозе, т.е. числа клеток,

положительных по аннексину V и отрицательных по метке иодидом пропидия (PI) к клеткам, положительным по аннексину V и PI.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphic Corp., USA). Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики – среднюю арифметическую и ошибку средней. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали U-критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Результаты исследования

Результаты исследования MTT-анализ показал, что клеточная линия мышинной меланомы B16-F10 обладает высокой чувствительностью к препарату ВПЧ-ФНО-альфа. Около 70 % популяции клеток утрачивают жизнеспособность под действием препарата в концентрациях от 1,2 до 30,5 мкг/мл, и его эффект зависит от дозы (таблица).

В результате оценки антипролиферативного эффекта препаратов ФНО-альфа и дсРНК на клетках меланомы B16-F10 установлено, что ФНО-альфа проявляет умеренную токсичность по отношению к опухолевым клеткам (рис. 1), и даже его высокие концентрации (9–46 мкг/мл) снижали количество живых клеток в популяции не более чем на 50 %. ДсРНК в исследованных концентрациях была менее токсична для опухолевых клеток, чем ФНО-альфа: максимальное снижение числа живых клеток составило 40 % (4,5–22,5 мкг/мл). По уровню цитотоксичности смесь ФНО-альфа и дсРНК соответствовала показателям токсичности индивидуального ФНО-альфа (данные не приведены). Эффект препарата ВПЧ-ФНО-альфа на клетки B16-F10 значительно превышал суммарный токсический эффект ФНО-альфа и дсРНК в

Таблица/Table

Жизнеспособность клеток B16-F10, инкубированных с ВПЧ-ФНО-альфа, в сравнении с контрольными необработанными клетками

Viability of B16-F10 cells incubated with VLP-TNF-alpha in comparison with untreated control cells

№ разведения/ No. breeding	Концентрация ВПЧ-ФНО-альфа, мкг/мл/ VLP-TNF-alpha concentration, µg/ml	Средняя оптическая плотность/ Optical Density	Ошибка среднего/ Error of mean	Индекс MTT/ MTT indices
1	30,5	0,208*	0,016	29 %
2	6,1	0,255*	0,009	36 %
3	1,2	0,220*	0,022	33 %
4	0,24	0,262*	0,023	37 %
5	0,049	0,359*	0,017	50 %
6	0,0097	0,336*	0,016	47 %
7	0,002	0,394*	0,025	55 %
8	0,0004	0,470*	0,016	66 %
9	0,000078	0,550*	0,029	77 %
10	контроль	0,711	0,029	100 %

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем по U-критерию Манна – Уитни (p≤0,05).

Note: * – a significant difference with the control, p≤0.05 (according to the Mann – Whitney U-criterion).

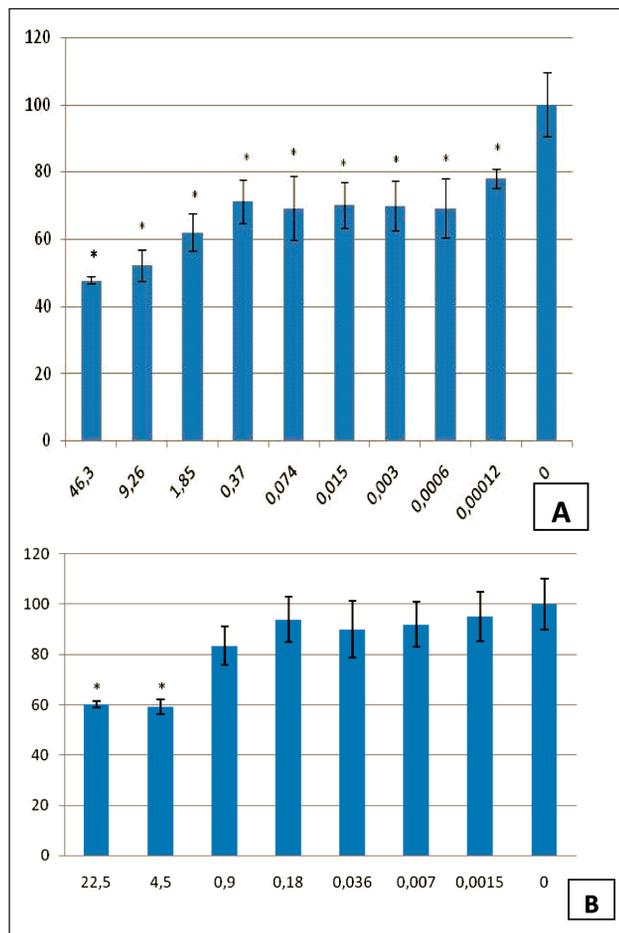


Рис. 1. Жизнеспособность клеток меланомы B16-F10 после инкубации в течение 72 ч с ФНО-альфа (А) и дсРНК (В) относительно показателя контрольных необработанных клеток. По оси абсцисс – концентрация препарата в культуральной среде, мкг/мл; по оси ординат – индексы МТТ, %. Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем (p<0,05)

Fig. 1. Viability of B16-F10 melanoma cells after incubation (72 hrs) with TNF-alpha (A) and dsRNA (B) relative to the untreated control cells. The values on the abscissa indicate the drug concentration in the culture medium, µg/ml; the values on the ordinate – MTT indices, %.

Notes: * – significant difference from control (p<0.05)

отдельности или в смеси. Снижение количества клеток на 50 % относительно контроля достигается при концентрациях: для комплексного препарата 0,05 мкг/мл, ФНО-альфа – 9,5 мкг/мл, дсРНК >20 мкг/мл (рис. 1).

Исследование апоптотических изменений клеток меланомы B16-F10 методом проточной цитофлуориметрии показало, что при контакте с ФНО-альфа и ВПЧ-ФНО-альфа в дозе 0,05 мкг/мл через 48 ч культивирования, 18,1 % и 38 % клеток меланомы подвергались апоптозу (рис. 2); к 72 ч культивирования погибало уже 38,1 % и 64,5 % клеток соответственно. ДсРНК в исследованных концентрациях апоптогенных свойств не проявляла.

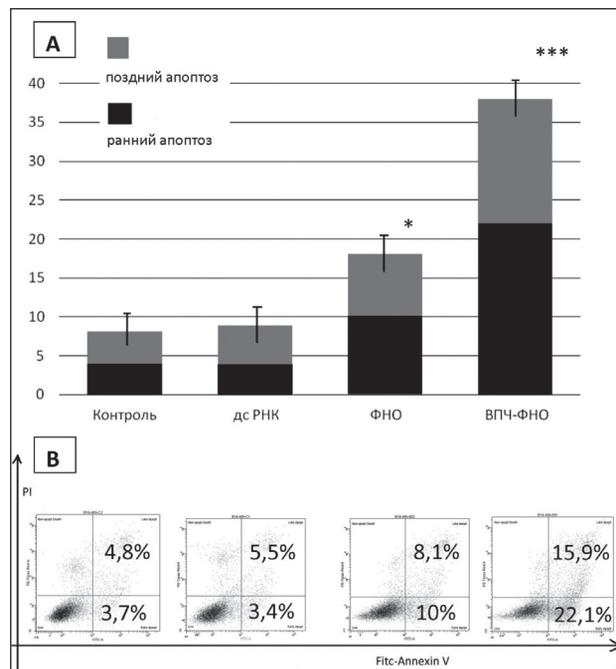


Рис. 2. Апоптоз клеток B16-F10 под действием ВПЧ-ФНО-альфа, дсРНК и ФНО-альфа, 48 ч инкубации, концентрация по ФНО-альфа и дсРНК 0,05 мкг/мл. Тест *in vitro* с аннексин-пропидий-йодидом, цитофлуориметрия. (А): По оси ординат – число клеток меланомы в разных фазах апоптоза, %; (В): По оси ординат – клетки, положительные по PI, по оси абсцисс – положительные по FITC-Annexin V. В правом нижнем квадрате – число клеток на стадии раннего апоптоза, %; в правом верхнем квадрате – на стадии позднего апоптоза, %.

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем (p<0,05), *** – по сравнению с контролем и ФНО-альфа (p<0,05)

Fig. 2. Apoptosis of B16-F10 cells induced by VLP-TNF-alpha, dsRNA, and TNF-alpha (48 hrs incubation). The concentration of TNF-alpha and dsRNA is 0.05 µg/ml. *In vitro* test with annexin-propidium iodide, cytofluorimetry.

(A): The ordinate shows the number of melanoma cells in different phases of apoptosis, %;

(B): The ordinate presents PI positive cells, the abscissa – FITC-Annexin V positive cells. The right lower square indicates the number of cells at early apoptosis, %; the upper right square – the number of cells at late apoptosis, %. Notes: significant difference: * – from control (p<0.05); *** – from control and TNF-alpha (p<0.05)

Обсуждение

Учитывая существующие в настоящее время проблемы терапии онкологических заболеваний, очевидно, что задача создания новых эффективных и безопасных противоопухолевых средств требует новых подходов. За последнее десятилетие был предложен ряд стратегий, учитывающих современные знания о противоопухолевом иммунитете. Один из подходов к созданию противоопухолевых препаратов нового поколения основан на конструировании средств адресной доставки цитокинов к клеткам опухоли [5, 6]. В ходе изучения противоопухолевых свойств ФНО-альфа в составе вирусоподобных частиц в экспериментах на мышах с трансплантированной карциномой Эрлиха был продемонстрирован высокий терапевтический по-

тенциал этого препарата: рост опухоли снижался при использовании ФНО-альфа в составе ВПЧ в дозах, в 10–100 раз меньших, чем при введении ФНО-альфа [6]. Вероятно, присутствие дсРНК может вносить существенный вклад в торможение роста опухоли: на модели перевивной меланомы В16-F10 были получены аналогичные результаты (неопубликованные данные). В ходе недавних исследований было обнаружено повышение уровня экспрессии ряда интерферон-стимулированных генов в перитонеальных макрофагах мыши [7] и клетках меланомы [15] в ответ на введение дрожжевой дсРНК. В литературе есть сведения об участии ИФН разных типов (альфа, бета и гамма), 2',5'-олигоденилатсинтетазы и протеинкиназы R в ангиогенезе и ингибировании пролиферации клеток и индукции апоптоза [16].

Полученные нами данные показали, что препарат ВПЧ-ФНО-альфа отличался достоверно более высоким антипролиферативным и апоптогенным действием на клетки меланомы В16-F10 по сравнению как с ФНО-альфа и дсРНК, так и с их смесью. Это позволяет заключить, что эффекты ВПЧ-ФНО-альфа не являются результатом простого суммирования эффектов отдельных компонентов конструкции или их взаимного потенцирования, но базируются на более сложных механизмах. Возможно, это связано с биологическими свойствами других компонентов вирусоподобной частицы. Так, например, известно, что полисахариды клеточных стенок бактерий, такие как зимозан и пептидогликаны, способны связываться с рецепто-

ром TLR2, который экспрессируется, в частности, меланоцитами и клетками меланомы [17]. Можно предположить, что полисахарид оболочки вирусоподобной частицы способен взаимодействовать с TLR2 и модулировать эффект ФНО-альфа через запуск дополнительных сигнальных каскадов. С другой стороны, микрочастицы декстрана способны усиливать доставку синтетической дсРНК роу I:C к эндосомам клетки [18], что может приводить к повышению доступности внутриклеточных TLR3 для дсРНК и усилению сигнала с рецепторов клеточной мембраны. Несомненно то, что вопрос о механизмах синергидного эффекта компонентов молекулярной конструкции важен и требует дальнейшего внимательного изучения.

Заключение

Изучение цитотоксического действия препарата ФНО-альфа в составе вирусоподобных частиц (ВПЧ-ФНО-альфа) на клеточную линию меланомы В16-F10 показало, что клетки меланомы обладают высокой чувствительностью к препарату, антипролиферативное действие которого оказалось дозозависимым. Комплексный препарат обладал более выраженным апоптогенным действием в отношении опухолевых клеток по сравнению с ФНО-альфа. Полученные результаты свидетельствуют о наличии синергидного антипролиферативного эффекта ФНО-альфа и дсРНК в составе конструкции, изучение молекулярных механизмов которого требует дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Bernardo A.R., Cosgaya J.M., Aranda A., Jiménez-Lara A.M. Synergy between RA and TLR3 promotes type I IFN-dependent apoptosis through upregulation of TRAIL pathway in breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 2013 Jan 31; 4: e479. doi: 10.1038/cddis.2013.5.
- Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб., 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbircev A.S. Cytokines. Saint Petersburg, 2008. 552 p. (in Russian)].
- Lienard D., Ewalenko P., Delmotte J.J., Renard N., Lejeune F.J. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol.* 1992 Jan; 10(1): 52–60. doi: 10.1200/JCO.1992.10.1.52.
- Чубенко В.А. Иммуноterapia на основе цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ТНФ, КСФ, Интерфероны). Практическая онкология. 2016; 17(2): 99–109. [Chubenko V.A. Immunotherapy is based on cytokines (IL-1, IL-2, FNO, CSF, IFN). *Practical Oncology.* 2016; 17(2): 99–109. (in Russian)]. doi: 10.31917/1702099.
- Xu G., Gu H., Hu B., Tong F., Liu D., Yu X., Zheng Y., Gu J. PEG-b-(PELG-g-PLL) nanoparticles as TNF- α nanocarriers: potential cerebral ischemia/reperfusion injury therapeutic applications. *Int J Nanomedicine.* 2017 Mar 23; 12: 2243–2254. doi: 10.21147/IJN.S130842.
- Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г.; ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Противопухолевое средство на основе наночастицы, несущей рекомбинантный фактор некроза опухолей альфа. Патент № 2386447 РФ, МКП А61К 38/19. № 2008140246/15; Заявл. 13.10.08; Опубл. 20.04.10, Бюл. № 11. [Masycheva V.I., Lebedev L.R., Danilenko E.D., Sysoeva G.M., Gamaley S.G.; State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector». An antitumor agent based on a nanoparticle carrying a recombinant tumor necrosis factor alpha. Patent No 2386447 of the Russian Federation, MKP A61K 38/19. № 2008140246/15; Publ. 04.20.10. (in Russian)].
- Chawla-Sarkar M., Leaman D.W., Borden E.C. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun; 7(6): 1821–31.
- Dai X., Zhang J., Arfuso F., Chinnathambi A., Zayed M.E., Alharbi S.A., Kumar A.P., Ahn K.S., Sethi G. Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015 Jun; 240(6): 760–73. doi: 10.1177/1535370215579167.
- Gantier M.P., Williams B.R. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Oct-Dec; 18(5–6): 363–71. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.06.016.
- Salaun B., Lebecque S., Matikainen S., Rimoldi D., Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res.* 2007 Aug 1; 13(15 Pt 1): 456574. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0274.
- Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д., Батенева А.В., Лебедев Л.Р., Масычева В.И. Фармакокинетика молекулярной конструкции для депонирования и транспортировки к клеткам-мишеням биологически активных веществ. *Сибирский медицинский журнал.* 2008; (3): 92–5. [Gamaley S.G., Danilenko E.D., Bateneva A.V., Lebedev L.R., Masycheva V.I. Pharmacokinetics of molecular construction for deposition and transportation of biologically active substances to target cells. *Siberian Journal of Oncology.* 2008; (3): 92–5. (in Russian)].
- Лебедев Л.Р., Аликин Ю.С., Рослякова Е.Ю., Подгорный В.Ф., Дубинкина О.С., Азаев М.Ш. Выделение и очистка двуспиральной рибонуклеиновой кислоты из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Биофармацевтический журнал.* 2014; 6(6): 32–8. [Lebedev L.R., Alikin Yu.S., Roslyakova E.Y., Podgorny V.F., Dubinkina O.S., Azaev M.Sh. Isolation and purification of double stranded RNA from killer strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Russian Journal of Biopharmaceuticals.* 2014; 6(6): 32–8. (in Russian)].
- Пустошилова Н.М., Килева Е.В., Денисова Л.Я., Шингарева Н.В., Коробко В.Г., Денисов Л.А., Масычева В.И., Сандахчиев Л.С., Калинин Ю.Т.; ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Способ получения рекомбинантного фактора некроза опухолей человека. Патент № 2144958 РФ, МКП C12N 15/28. № 97106895; Заявл. 23.04.97; Опубл. 27.01.00, Бюл. № 3. [Pustoshilova N.M., Kileva E.V., Denisova L.Ya., Shingareva N.V., Korobko V.G., Denisov L.A., Masycheva V.I., Sandakhchiev L.S., Kalinin Yu .T.; State Scientific Center of Virology and Bio-

technology «Vector». A method of producing a recombinant human tumor necrosis factor. Patent No. 2144958 of the Russian Federation, MCP C12N 15/28. № 97106895; Publ. 01.27.00. (in Russian)].

14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16; 65(1–2): 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

15. Zhao Y, Liu H, Xu L, Guo B, Kalvakolanu D.V, Liu X, Hu J, Zhang D, Sun Y, Zhang L, Xu D, Zhao X. Synergistic Suppression of Melanoma Growth by a Combination of Natural dsRNA and Panaxadiolsaponins. J Interferon Cytokine Res. 2018 Sep; 38(9): 378–387. doi: 10.1089/jir.2018.0037.

16. Chawla-Sarkar M, Lindner D.J, Liu Y.F, Williams B.R, Sen G.C, Silverman R.H, Borden E.C. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. Apoptosis. 2003 Jun; 8(3): 237–49. doi: 10.1023/a:1023668705040.

17. Coati L, Miotto S, Zanetti L, Alaibac M. Toll-like receptors and cutaneous melanoma. Oncol Lett. 2016; 12(5): 3655–3661. doi: 10.3892/ol.2016.5166.

18. Peine K.J, Bachelder E.M, Vangundy Z, Papenfuss T, Brackman D.J, Galovic M.D, Schully K, Pesce J, Keane-Myers A, Ainslie K.M. Efficient delivery of the toll-like receptor agonists polyinosinic:polycytidylic acid and CpG to macrophages by acetalated dextran microparticles. Mol Pharm. 2013 Aug 5; 10(8): 2849–57. doi: 10.1021/mp300643d.

Поступила/Received 02.07.2019
Принята в печать/Accepted 17.12.2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Вязовая Елена Алексеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (г. Бердск, Россия). E-mail: viazovaia@mail.ru. SPIN-код: 3768-1883.

Лебедев Леонид Рудольфович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (г. Бердск, Россия). SPIN-код: 4637-3440.

Даниленко Елена Дмитриевна, кандидат биологических наук, директор ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (г. Бердск, Россия). SPIN-код: 1388-4127. Researcher ID (WOS): A-7083-2014. ORCID: 0000-0001-5026-1602.

ВКЛАД АВТОРОВ

Вязовая Елена Алексеевна: разработка концепции научной работы, статистическая обработка, составление черновика рукописи.

Лебедев Леонид Рудольфович: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Даниленко Елена Дмитриевна: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», Государственный контракт № 14.N08.12.0089 от 29.08.2016 г.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Elena A. Vyazovaya, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor (Berdsk, Russia). E-mail: viazovaia@mail.ru.

Leonid R. Lebedev, MD, DSc, Head of the Laboratory of Nucleic Acids and Recombinant Proteins, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor (Berdsk, Russia).

Elena D. Danilenko, MD, PhD, Director of the Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor (Berdsk, Russia). Researcher ID (WOS): A-7083-2014. ORCID: 0000-0001-5026-1602.

AUTHOR CONTRIBUTION

Elena A. Vyazovaya: concept design, statistical data analysis, drafting of the manuscript.

Leonid R. Lebedev: analysis of the study results, critical revision for the important intellectual content.

Elena D. Danilenko: analysis of the study results, critical revision for the important intellectual content.

Funding

The study was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of the Federal target program «Development of pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond», State Contract No. 14.N08.12.0089 of August 29, 2016.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.