

Для цитирования: Кит О.И., Игнатов С.Н., Златник Е.Ю., Солдаткина Н.В., Росторгуев Э.Е., Сагакянц А.Б., Бондаренко Е.С., Ситковская А.О. Онколитическая виротерапия в лечении глиобластомы: достижения и проблемы клинических исследований (обзор литературы). Сибирский онкологический журнал. 2020; 19(6): 133–140. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-6-133-140.

For citation: Kit O.I., Ignatov S.N., Zlatnik E.Yu., Soldatkina N.V., Rostorguev E.E., Sagakyants A.B., Bondarenko E.S., Sitkovskaya A.O. Oncolytic virotherapy in glioblastoma treatment: progress and challenges in clinical research (literature review). Siberian Journal of Oncology. 2020; 19(6): 133–140. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-6-133-140.

## ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ ВИРОТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

**О.И. Кит, С.Н. Игнатов, Е.Ю. Златник, Н.В. Солдаткина, Э.Е. Росторгуев,  
А.Б. Сагакянц, Е.С. Бондаренко, А.О. Ситковская**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России»,  
г. Ростов-на-Дону, Россия  
Россия, г. Ростов-на-Дону, 344037, ул. 14-я линия, 63. E-mail: Ignatov\_Sergey\_@mail.ru

### Аннотация

Глиальные опухоли составляют около 60 % от всех первичных опухолей головного мозга, при этом 70 % из них имеют морфологические признаки высокой степени злокачественности (High Grade Gliomas III, IVWHO 2016) [1, 2]. Значительный технический до- и интраоперационный прогресс, развитие методов лучевой и химиотерапии не изменили общую медиану выживаемости, которая составляет менее 20 мес [3], а при рецидиве – менее 12 мес [4]. По современным представлениям химио- и радиорезистентность обусловлены наличием опухолевых стволовых клеток [5, 6]. Неудовлетворительные результаты лечения обуславливают необходимость разработки и внедрения новых подходов в терапии глиом высокой степени злокачественности. В последние годы все большее внимание уделяется разработке иммунотерапевтических подходов к лечению, в том числе и разработке онколитической виротерапии. С помощью методов геномной инженерии разрабатывается таргетная тропность к опухолевым клеткам, различные вирусные векторы. Изучается синергизм вирусов и адъювантной терапии. Несмотря на перспективность данного направления и всестороннюю экспериментальную проработку механизмов онколизиса [1], анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что лишь единичные сообщения о клинических исследованиях I–II фазы. В представленном обзоре рассмотрены наиболее успешные применения онколитических вирусов в отношении глиобластомы в моделях на животных и их трансляции в клинических условиях у пациентов.

**Ключевые слова:** онколитическая виротерапия, глиобластома, глиома высокой степени злокачественности.

## ONCOLYTIC VIROTHERAPY IN GLIOBLASTOMA TREATMENT: PROGRESS AND CHALLENGES IN CLINICAL RESEARCH (LITERATURE REVIEW)

**O.I. Kit, S.N. Ignatov, E.Yu. Zlatnik, N.V. Soldatkina, E.E. Rostorguev,  
A.B. Sagakyants, E.S. Bondarenko, A.O. Sitkovskaya**

National Medical Research Center of Oncology of the Health Ministry of the Russian Federation,  
Rostov-on-Don, Russia  
63, 14 Liniya str., 344037, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: Ignatov\_Sergey\_@mail.ru

## Abstract

Glial tumors comprise about 60 % of primary malignant brain tumors, and 70 % of them show morphological signs of high-grade cancer (High Grade Gliomas III, IV WHO 2016) [1, 2]. Despite a significant technical pre- and intraoperative progress as well as advances in radiotherapy and chemotherapy, the overall median survival is very low, being less than 20 months [3] and less than 12 months in patients with relapse [4]. Recent studies have shown that chemo- and radioresistance is due to the existence of cancer stem cells [5, 6]. Poor treatment outcomes require the development and implementation of new approaches to the treatment of high-grade gliomas. In recent years, increasing attention has been paid to the development of immunotherapeutic treatment approaches, including the development of oncolytic virotherapy. Tropism to target cancer cells, as well as various viral vectors, has been developed using methods of genetic engineering; synergism of viruses and adjuvant therapy has been studied. Despite extensive experimental studies of the mechanism of oncolysis [1], there are only a few reports on Phase I–II clinical trials. This review considers the most successful applications of oncolytic viruses in relation to glioblastoma in animal models and their translation into clinical practice in patients.

**Key words:** oncolytic virotherapy, glioblastoma, high grade gliomas.

Несмотря на улучшение диагностики и лечения онкологических заболеваний, смертность от них занимает 2-е место в мире в общей структуре летальных исходов. Согласно данным CBTRUS, частота выявляемости первичных злокачественных опухолей головного мозга в США в 2018 г. составила 121 277 случаев; в пересчете на 100 тыс. населения – 7,12 случая. В среднем в США регистрируется до 16 000 летальных исходов в год от первичных злокачественных опухолей головного мозга. В России частота встречаемости первичных злокачественных новообразований головного мозга в 2017 г. составила 6,02 на 100 тыс. населения [7].

Инфильтративный рост, локализация опухоли в функционально значимых областях головного мозга, резистентность опухоли к радио- и химиотерапии, вызванная, как считается в настоящее время, наличием опухолевых стволовых клеток, заставили развить виротерапевтические подходы к лечению. Глиобластома (ГБ) почти с самого начала развития концепции онколитической виротерапии рассматривалась в качестве основного кандидата для такого подхода ввиду неудовлетворительных результатов комплексного лечения, наличия гематоэнцефалического барьера, инфильтративного роста опухоли, наличия нейроспецифических маркерных белков опухолевых стволовых клеток [8–10].

Виротерапия базируется на 2 основных подходах: использовании цитолитического воздействия природных вирусов либо создании новых вирусных векторов с их последующим клиническим применением. Кроме того, виротерапия может рассматриваться в контексте иммунотерапии, поскольку вирусы являются экзогенными антигенами и могут проявлять адьювантный эффект [11]. Современная эра онколитической виротерапии глиальных опухолей началась в 90-х годах прошлого столетия, когда развитие генной инженерии сделало возможным конструирование вирусного генома, а понимание основных молекулярно-генетических механизмов канцерогенеза и вирусной инвазии

позволило определить мишени, обеспечивающие тропность вирусов к опухолевым клеткам. Её родоначальниками при ГБ можно считать R.L. Martuza et al., которые в 1991 г. сообщили об использовании тимидинкиназа-отрицательного вируса простого герпеса (herpes simplex virus-1) с ослабленной нейровирулентностью для лечения ГБ *in vivo* после того, как была показана онколитическая активность на культуре клеток человека *in vitro*. Бестимусным мышам пересаживалась культура клеток ГБ человека U87 подкожно, субрентально, интракраниально. Интракраниальное введение тимидинкиназа-отрицательного вируса простого герпеса замедляло рост опухоли, что увеличивало медиану выживаемости [12].

В 2005 г. G. Wollmann et al. сообщили об изучении онколитических свойств в отношении глиобластом *in vitro* у 9 вирусов. В результате было установлено, что онколитической активностью обладают: вирус везикулярного стоматита, вирус Синдбис, мелкий мышинный вирус i-штамма и р-штамма. Онколитическая активность практически не отмечалась у цитомегаловируса человека и мышей, вируса болезни Ауески, вируса SV40 (simianvirus 40), аденоассоциированного вируса [13]. В настоящее время известны около 20 потенциальных онколитических вирусов, принадлежащих более чем к 10 различным вирусным семействам. В данной статье приведены наиболее успешные результаты исследования онколитической активности в отношении модели глиобластомы у животных и глиобластомы у людей.

#### Вирус болезни Ньюкасла

Данный вирус лидирует среди онколитических вирусов по числу испытаний на моделях животных. В 2006 г. A.I. Freeman et al. сообщили о результатах I–II фазы исследований онколитической активности вируса болезни Ньюкасла (NDV-HUJ) у 45 пациентов с рецидивом ГБ при внутривенном введении. Средняя выживаемость пациентов составила 45 нед. В данном исследовании было продемонстрировано не увеличение средней выжи-

ваемости, а наличие низкой токсичности данного вируса, что может служить основой для разработки вирусных векторов [14].

#### **Герпес-вирусы**

Все онколитические штаммы были получены путем генноинженерной модификации. Инактивация генов вирусной тимидинкиназы и рибонуклеотидредуктазы приводила к блокированию репликации вируса в нормальных медленно делящихся клетках, что обеспечивало селективность вируса в отношении быстро делящихся опухолевых клеток [15].

В 2012 г. R. Kanai et al. сообщили о результатах синергизма генетически модифицированного вируса простого герпеса и ингибиторов активации фермента фосфатидилинозитол-3-киназы (трицирибин). Данный путь активации является универсальным для большинства клеток и контролирует процессы пролиферации, метаболизма, роста, апоптоза. Гиперактивация данного сигнального пути в большинстве случаев сочетается с онкопатологией [16] и встречается до 80 % при ГБ [17]. Стволовые клетки ГБ также чувствительны к ингибиторам фосфатидилинозитол-3-киназы [18].

В исследовании использовался вирус простого герпеса 1-го типа (MG18L): с делецией гена Us3, продукт которого вызывал активацию фосфатидилинозитол-3-киназы и ингибировал вирус-индуцированный апоптоз. При исследовании *in vivo* на белых мышах (альбиносах) данный вирус показал свою безопасность при интрацеребральном введении, способность к репликации в стволовых клетках, а при одновременном введении ингибиторов фермента фосфатидилинозитол-3-киназа – способность усиливать апоптоз в опухолевых стволовых клетках. В результате данной комбинации выживаемость мышей увеличилась на 50 % по сравнению с монотерапией [19].

В 2015 г. T.R. Whisenhunt et al. сообщили о 6-летнем безрецидивном периоде у пациентки с верифицированной ГБ. У пациентки 52 лет по данным биопсии была верифицирована ГБ с индексом пролиферативной активности Ki67 – 33 %. Было выполнено удаление опухоли с последующей лучевой терапией 60 Гр. Через 3 мес после операции по данным МРТ отмечен рецидив ГБ. Был проведен курс химиотерапии (ломустин, темозоламид). Через 2 мес при выполнении МРТ отмечен продолженный рост. Пациентке интратуморально в рамках протокола Neovir G207 был введен генетически измененный вирус простого герпеса G207. Через 1 мес отмечалось прогрессирование опухоли по данным МРТ, проведен курс прокарбазина. Через 2 мес ввиду нарастания неврологического дефицита и прогрессирования опухоли по данным МРТ выполнена повторная резекция опухоли, 4 курса химиотерапии иринотеканом. В дальнейшем отмечалась ремиссия в течение 6 лет [20].

В 2016 г. D. Patel et al. сообщили о начале I фазы клинических испытаний генетически модифицированного вируса простого герпеса M032, экспрессирующего IL-12, в лечении ГБ. Ранее противоопухолевый эффект и безопасность были продемонстрированы на моделях метастатического поражения головного мозга и первичных опухолях *in vivo* на иммунодефицитных мышах и обезьянах [21, 22]. IL-12 обладает выраженным противоопухолевым эффектом: индуцируя продукцию  $\gamma$ -интерферона, усиливает цитолитическую активность НК клеток и цитотоксичность Т-лимфоцитов, а также блокирует неоангиогенез [23, 24]. При исследовании на иммунодефицитных мышах интратуморальное введение вируса увеличивало выживаемость в 2 раза, а при завершении эксперимента на 150-е сут при гистологическом исследовании у 20 % мышей опухолевые клетки в головном мозге не были обнаружены. В рамках исследования планируется оценить безопасность, максимальную дозировку вируса M032 для интратуморального введения пациентам с нерезектабельной опухолью, определить локальный и системный иммунный ответ, оценить клинический эффект [25].

#### **Аденовирус**

Идентифицировано более 50 серотипов аденовируса человека, однако большинство онколитических аденовирусов сконструировано на основе вируса 5-го серотипа [26]. В. Georger et al. (2004) оценили онколитические свойства аденовируса с возможностью экспрессировать ген P53 (adenovirus AdDelta 24, adenovirus AdDelta 24-p53) и без. Исследование проводилось на бестимусных мышах, которым прививалась культура клеток ГБ человека, а затем пятикратно интратуморально вводился аденовирус. В дальнейшем 2–3 раза в нед проводилось измерение размеров опухоли путем нейровизуализации. Исследование продолжалось 120 дней. Результаты показали различный эффект исследованных вирусов. При введении adenovirus AdDelta 24 в среднем отмечалось 24-дневное отсутствие роста, в 30 % наблюдался регресс опухоли, а у 30 % мышей с выживаемостью более 120 дней определялся либо минимальный остаточный объем опухоли, либо опухоль не выявлялась. При введении такой же дозы adenovirus AdDelta 24-p53 в среднем отмечалась 113-дневная задержка в росте, в 70 % случаев – регресс опухоли, а у 60 % мышей с выживаемостью более 120 дней определялся либо минимальный оставшийся объем опухоли, либо опухоль не определялась. При патоморфологическом исследовании выявлены повышенная репликация вируса в опухолевых клетках, индукция апоптоза, воспалительная инфильтрация клеток опухоли, некроз [27].

#### **Вирус миксомы**

В 2013 г. F.J. Zemp et al. сообщили о результатах исследования онколитической активности вируса

миксомы при монотерапии и в комбинации с рапамицином *in vivo*, *in vitro*. В результате исследований *in vitro* была показана онколитическая активность как в отношении клеток ГБ вне зависимости от их чувствительности к темодалу, так и повышенная репликация вируса в них при терапии рапамицином [28–30]. *In vivo* исследования проводились на иммунодефицитных мышах SCID, которым интрацеребрально прививались клетки ГБ человека, чувствительной и нечувствительной к темодалу. Рост опухоли оценивался с помощью MPT. С 21-х сут после имплантации опухоли интратуморально вводили вирус миксомы и внутрибрюшинно рапамицин по отдельности и в комбинации. При имплантации темодал-нечувствительной ГБ введение комбинации вируса и рапамицина привело к увеличению выживаемости практически в 2 раза, а при темодал-чувствительной – на 30 % по сравнению с контролем. Кроме того, в обеих опытных группах отмечено уменьшение экспрессии маркеров стволовых клеток – Sox2, nestin, TuJ1, Musashi-1 [31].

#### Вирус кори

В 2008 г. С. Allen et al. сообщили об изучении онколитических свойств вируса кори, содержащего ген гемагглютинаина, обуславливающего связывание с клеточным рецептором CD46, экспрессия которого повышается в опухолевых клетках [32, 33], в частности в глиомах [34]. В исследовании оценивали онколитическую активность аттенуированного штамма вакцины Эдмонстона, способного экспрессировать карциноэмбрионный антиген MV-CEA [35, 36]. По экспрессии данного антигена в крови определялась активность репликации вируса. Показано отсутствие у данного вируса цитолитической активности по отношению к нормальным астроцитам. Его онколитическая активность была доказана *in vivo* на бестимусных мышах, которым прививалась ГБ человека [37]. Этими авторами также была доказана эффективность и безопасность применения вируса в отношении приматов с привитой ГБ человека [38]. Проведенные исследования послужили основой для начала I фазы клинических испытаний на пациентах с рецидивом ГБ, анамнестически привитых от кори. На момент выхода статьи в эксперименте приняли участие 3 человека. Токсических осложнений на интратуморальное введение MV-CEA не отмечено [39].

В 2013 г. P. Bach et al. сообщили о результатах исследования онколитических свойств генетически модифицированных вирусов кори – MV-141.7 и MV-AC133, проявляющих свою активность в отношении опухолевых стволовых клеток, экспрессирующих антиген CD133. Экспрессия CD133 коррелирует с плохой выживаемостью у больных глиомами [40, 41]. *In vivo* исследования проводились на иммунодефицитных мышах линии NOD/SCID, которым интрацеребрально прививались CD133+ клетки ГБ человека. В группе без лечения средняя выживаемость составила 30 дней. В груп-

пах с интратуморальным введением вируса – 90 дней. При введении вируса MV-141.7 бессобытийный период составил 70 дней, а при введении вируса MV-AC133 – 50 дней [42].

#### Полиовирус

Единственным клеточным рецептором для полиовирусов является гликопротеин CD155, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов. Данный рецептор секретируется опухолевыми стволовыми клетками. В 2018 г. A. Desjardins et al. сообщили о результатах лечения 61 пациента с рецидивом ГБ путем интратуморального введения рекомбинантного полиовируса – PVSRIPO. Данный вирус продемонстрировал тропность к клеткам, экспрессирующим антиген CD155 [43]. Исследование проводилось с 2012 по 2017 г. с целью определения максимальной нетоксичной дозы вируса для интратуморального введения и оценки общей выживаемости в сравнении с ретроспективными данными. Был отмечен единичный эпизод кровоизлияния в ложе опухоли, что потребовало хирургического удаления внутримозговой гематомы. На момент выхода статьи послеоперационная выживаемость этого пациента составила 57,5 мес. Таких осложнений, как энцефалит, полиомиелит, менингит, системные аутоиммунные реакции, не отмечалось. Общая медиана выживаемости пациентов при лечении PVSRIPO составила 27,6 мес; 13 пациентов преодолели 5-летнюю выживаемость, а 2 больных пережили 69 мес [44].

#### Парвовирус

Репликация данного вируса возможна только в активно пролиферирующих клетках. В 2017 г. K. Geletneky et al. сообщили о результатах I и II фазы клинических испытаний онколитического препарата ParvOgux у 18 пациентов с впервые выявленной или рецидивной ГБ, которым было возможно выполнить суб- или тотальную резекцию опухоли. Всем пациентам проводилась лучевая и химиотерапия. В 1-ю группу было включено 12 пациентов, на 1-м этапе лечения им однократно интратуморально вводился ParvOgux, 2-м этапом на 10-е сут выполнялось удаление опухоли с одновременным введением в ложе препарата ParvOgux. Во 2-ю группу включено 6 пациентов, которым вначале внутривенно вводился ParvOgux с 1-х по 5-е сут, затем на 10-е сут выполнялось удаление опухоли с одновременным введением в ложе препарата ParvOgux. При молекулярно-генетическом исследовании мутация гена IDH1 не обнаружена. Метилирование промотора MGMT найдено у 2 пациентов. У 12 пациентов отмечен рост опухоли в течение 6 мес; 5 пациентов умерли в течение 6 мес. Общая медиана выживаемости составила 464 дня. Разница безрецидивного периода и общая выживаемость оказались незначимыми в обеих группах.

В результате исследования доказана способность вируса проникать через гематоэнцефалический-опухолевый барьер, что делает возможным его внутривенное введение. При исследовании каловых



масс и биологических жидкостей не обнаружено инфекционных вирусных частиц, что доказывает безопасность применения ParvOgux для окружающих. При обоих способах введения не отмечено системного воспалительного ответа, токсического воздействия на системы организма. Способность вируса проникать через гематоэнцефалический-опухольный барьер, отсутствие токсического воздействия создают предпосылки для дальнейших исследований [45].

#### Коронавирус

В 2009 г. M.H. Verheije et al. сообщили о результатах исследования онколитической активности коронавируса по отношению к культуре клеток ГБ *in vivo*. В качестве образца был взят наиболее изученный представитель данного семейства – вирус мышинного гепатита, не способный поражать неизмененные клетки человека [46, 47]. С помощью методов генной инженерии была выработана тропность вируса к клеткам, синтезирующим эпидермальный фактор роста. Бестимусным мышам интракраниально была имплантирована культура клеток ГБ человека U87ΔEGFR. Без лечения медиана выживаемости мышей составила 16 дней, при интратуморальном введении вируса – 41 день. Эта работа является первой, в которой продемонстрирована онколитическая активность коронавируса *in vivo*, что дает предпосылки для дальнейших клинических исследований [48].

#### Вирус Зика

В 2017 г. Z. Zhu et al. оценили онколитическую активность вируса Зика в отношении стволовых клеток ГБ. Инфицирование с последующим лизированием в основном проявлялось в отношении стволовых клеток ГБ и в меньшей степени для дифференцированных опухолевых клеток и неизмененных клеток нервной системы. Вирус Зика замедлял рост культуры клеток человеческой ГБ как *in vitro*, так и *in vivo* на модели бестимусных мышей [49]. Авторы указывают, что данный вирус является онколитическим с преимущественной направленностью на стволовые клетки ГБ, что делает его перспективным для дальнейших исследований.

#### Заключение

Развитие методов молекулярной диагностики, генной инженерии, клеточных технологий, точных систем визуализации в XXI веке заставило по-новому взглянуть на многие проблемы клинической медицины, включая проблему виротерапии злокачественных глиом. Известна онколитическая активность широкого спектра вирусов, патогенных и непатогенных для человека, что обусловлено та-

ким их биологическим свойством, как облигатное паразитирование в клетках, наблюдаемое при их культивировании *in vitro*. Исследования на моделях животных-опухоленосителей также демонстрируют эффект в виде торможения или регрессии эктопически или ортотопически перевитой глиомы человека. Показана возможность создания генетически модифицированных вирусов, обладающих тропностью к ткани мозга, способных преодолеть гематоэнцефалический барьер и вмешиваться в процессы метаболизма, пролиферации, дифференцировки клеток-мишеней. Однако даже при успешных доклинических испытаниях, выполненных на высоком методическом уровне и подтвержденных современными методами, трансляция результатов в клинику оказалась значительно менее успешной, и многие исследования не приобрели клинического продолжения. Количество выполняемых в настоящее время клинических испытаний немногочисленно, как и число больных в каждом из них, вследствие чего индивидуальная вариабельность эффекта не дает возможности объективной оценки. Несмотря на представления об иммунодепрессии, развивающейся у онкологических больных, их иммунная система проявляет активность, приводящую как к элиминации вируса, так и к формированию благоприятного для опухоли иммунологического микроокружения [50, 51]. Целый комплекс иммунологических клеточных и гуморальных факторов с тонкими и сложными взаимодействиями между ними невоспроизводим на иммунодефицитных животных. Кроме того, человеческая глиома, растущая в организме мыши, может менять свои молекулярно-биологические характеристики. Развитие вследствие таких изменений у опухолевых клеток резистентности к вирусам по типу химиорезистентности – еще одна возможная причина скромных клинических результатов виротерапии глиом. Несмотря на развитие данного направления, на данный момент нет универсального онколитического вируса, способного инфицировать и убивать все опухолевые клетки, не повреждая здоровые; перспективы его создания пока неясны.

На основании проведенного анализа литературы наиболее многообещающим представляется создание онколитических вирусов, тропных к опухолевым стволовым клеткам глиом. Для успешного решения этой задачи необходимы разработка и использование широкой панели онколитических вирусов, нацеленных на различные опухолевые маркеры, а также предварительное тестирование пациентов по данным маркерам, что позволит индивидуально подбирать оптимальную терапию.

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Бахлаушев В.П., Горяинов С.А., Павлова Г.В., Потанов А.А., Чехонин В.П. Онколитические вирусы в лечении низкодифференцированных глиом. Клиническая практика. 2015; 2: 46–59. [Baklaushev V.P., Gorjajnov S.A., Pavlova G.V., Potanov A.A., Chehonin V.P. Oncolytic viruses in high-grade gliomas treatment. Clinical Practice. 2015; 2: 46–59. (in Russian)].

2. Foreman P.M., Friedman G.K., Cassady K.A., Markert J.M. Oncolytic Virotherapy for the Treatment of Malignant Glioma. Neurotherapeutics. 2017 Apr; 14(2): 333–344. doi: 10.1007/s13311-017-0516-0.

3. Gilbert M.R., Dignam J.J., Armstrong T.S., Wefel J.S., Blumenthal D.T., Vogelbaum M.A., Colman H., Chakravarti A., Pugh S., Won M., Jeraj R., Brown P.D., Jaeckle K.A., Schiff D., Stieber V.W., Brachman D.G., Werner-Wasik M., Tremont-Lukats I.W., Sulman E.P., Aldape K.D., Cur-

- ran W.J. Jr., Mehta M.P. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014; 370(8): 699–708. doi: 10.1056/NEJMoa1308573.
4. Taal W., Oosterkamp H.M., Walenkamp A.M., Dubbink H.J., Beer-epoot L.V., Hanse M.C., Buter J., Honkoop A.H., Boerman D., de Vos F.Y., Dinjens W.N., Enting R.H., Taphoorn M.J., van den Berkmortel F.W., Jansen R.L., Brandsma D., Bromberg J.E., van Heuvel I., Vernhout R.M., van der Holt B., van den Bent M.J. Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Aug; 15(9): 943–53. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70314-6.
5. Batlle E., Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017 Oct 6; 23(10): 1124–1134. doi: 10.1038/nm.4409.
6. Bischof J., Westhoff M.A., Wagner J.E., Halatsch M.E., Trentmann S., Knippschild U., Wirtz C.R., Burster T. Cancer stem cells: The potential role of autophagy, proteolysis, and cathepsins in glioblastoma stem cells. *Tumour Biol.* 2017 Mar; 39(3): 1010428317692227. doi: 10.1177/1010428317692227.
7. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М., 2018. 250 с. [Kaprin A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Moscow, 2018. 250 p. (in Russian)].
8. Hulou M.M., Cho C.F., Chiocca E.A., Bjerkvig R. Experimental therapies: gene therapies and oncolytic viruses. *Handb Clin Neurol.* 2016; 134: 183–97. doi: 10.1016/B978-0-12-802997-8.00011-6.
9. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006 Dec 7; 444(7120): 756–60. doi: 10.1038/nature05236.
10. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004 Nov 18; 432(7015): 396–401. doi: 10.1038/nature03128.
11. Kaufmann J.K., Chiocca E.A. Glioma virus therapies between bench and bedside. *Neuro Oncol.* 2014 Mar; 16(3): 334–51. doi: 10.1093/neuro/nt0310.
12. Martuza R.L., Malick A., Markert J.M., Ruffner K.L., Coen D.M. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science.* 1991 May 10; 252(5007): 854–6. doi: 10.1126/science.1851332.
13. Wollmann G., Tattersall P., van den Pol A.N. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J Virol.* 2005 May; 79(10): 6005–22. doi: 10.1128/JVI.79.10.6005-6022.2005.
14. Freeman A.I., Zakay-Rones Z., Gomori J.M., Linetsky E., Rasooly L., Greenbaum E., Rozenman-Yair S., Panet A., Libson E., Irving C.S., Galun E., Stegal T. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther.* 2006; 13(1): 221–8. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.08.016.
15. Manservigi R., Argnani R., Marconi P. HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy. *Open Virol J.* 2010; 4: 123–56. doi: 10.2174/1874357901004030123.
16. McCubrey J.A., Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Montalto G., Cervello M., Nicoletti F., Fagone P., Malaponte G., Mazzarino M.C., Candido S., Libra M., Bäsecke J., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Milella M., Tafuri A., Cocco L., Evangelisti C., Chiarini F., Martelli A.M. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget.* 2012 Sep; 3(9): 954–87. doi: 10.18632/oncotarget.652.
17. Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I.M., Gallia G.L., Olivi A., McLendon R., Rasheed B.A., Keir S., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Busam D.A., Tekleab H., Diaz L.A. Jr., Hartigan J., Smith D.R., Strausberg R.L., Marie S.K., Shinjo S.M., Yan H., Riggins G.J., Bigner D.D., Karchin R., Papadopoulos N., Parmigiani G., Vogelstein B., Velculescu V.E., Kinzler K.W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008 Sep 26; 321(5897): 1807–12. doi: 10.1126/science.1164382.
18. Gallia G.L., Tyler B.M., Hann C.L., Siu I.M., Giranda V.L., Vescovi A.L., Brem H., Riggins G.J. Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Mol Cancer Ther.* 2009 Feb; 8(2): 386–93. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0680.
19. Kanai R., Wakimoto H., Martuza R.L., Rabkin S.D. A novel oncolytic herpes simplex virus that synergizes with phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway inhibitors to target glioblastoma stem cells. *Clin Cancer Res.* 2011 Jun 1; 17(11): 3686–96. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3142.
20. Whisenant T.R. Jr., Rajneesh K.F., Hackney J.R., Markert J.M. Extended disease-free interval of 6 years in a recurrent glioblastoma multiforme patient treated with G207 oncolytic viral therapy. *Oncolytic Virother.* 2015 Jan 30; 4: 33–8. doi: 10.2147/OV.S62461.
21. Parker J.N., Bauer D.F., Cody J.J., Markert J.M. Oncolytic viral therapy of malignant glioma. *Neurotherapeutics.* 2009; 6(3): 558–69. doi: 10.1016/j.nurt.2009.04.011.
22. Friedman G.K., Pressey J.G., Reddy A.T., Markert J.M., Gillespie G.Y. Herpes simplex virus oncolytic therapy for pediatric malignancies. *Mol Ther.* 2009 Jul; 17(7): 1125–35. doi: 10.1038/mt.2009.73.
23. Lu X. Impact of IL-12 in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017; 17(8): 682–697. doi: 10.2174/1568009617666170427102729.
24. Chiu T.L., Wang M.J., Su C.C. The treatment of glioblastoma multiforme through activation of microglia and TRAIL induced by rAAV2-mediated IL-12 in a syngeneic rat model. *J Biomed Sci.* 2012; 19(1): 45. doi: 10.1186/1423-0127-19-45.
25. Patel D.M., Foreman P.M., Nabors L.B., Riley K.O., Gillespie G.Y., Markert J.M. Design of a Phase I Clinical Trial to Evaluate M032, a Genetically Engineered HSV-1 Expressing IL-12, in Patients with Recurrent/Progressive Glioblastoma Multiforme, Anaplastic Astrocytoma, or Gliosarcoma. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2016 Jun; 27(2): 69–78. doi: 10.1089/humc.2016.031.
26. Shirakawa T. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy. *Mol Cells.* 2008 Jun 30; 25(4): 462–6.
27. Georger B., Vassal G., Opolon P., Dirven C.M., Morizet J., Laudani L., Grill J., Giaccone G., Vandertop W.P., Gerritsen W.R., van Beusechem V.W. Oncolytic activity of p53-expressing conditionally replicative adenovirus AdDelta24-p53 against human malignant glioma. *Cancer Res.* 2004 Aug 15; 64(16): 5753–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0499.
28. Lun X., Yang W., Alain T., Shi Z.Q., Muzik H., Barrett J.W., McFadden G., Bell J., Hamilton M.G., Senger D.L., Forsyth P.A. Myxoma virus is a novel oncolytic virus with significant antitumor activity against experimental human gliomas. *Cancer Res.* 2005; 65(21): 9982–90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1201.
29. Lun X., Alain T., Zemp F.J., Zhou H., Rahman M.M., Hamilton M.G., McFadden G., Bell J., Senger D.L., Forsyth P.A. Myxoma virus virotherapy for glioma in immunocompetent animal models: optimizing administration routes and synergy with rapamycin. *Cancer Res.* 2010 Jan 15; 70(2): 598–608. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1510.
30. Lun X.Q., Zhou H., Alain T., Sun B., Wang L., Barrett J.W., Stanford M.M., McFadden G., Bell J., Senger D.L., Forsyth P.A. Targeting human medulloblastoma: oncolytic virotherapy with myxoma virus is enhanced by rapamycin. *Cancer Res.* 2007 Sep 15; 67(18): 8818–27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1214.
31. Zemp F.J., Lun X., McKenzie B.A., Zhou H., Maxwell L., Sun B., Kelly J.J., Stechishin O., Luchman A., Weiss S., Cairncross J.G., Hamilton M.G., Rabinovich B.A., Rahman M.M., Mohamed M.R., Smallwood S., Senger D.L., Bell J., McFadden G., Forsyth P.A. Treating brain tumor-initiating cells using a combination of myxoma virus and rapamycin. *Neuro Oncol.* 2013 Jul; 15(7): 904–20. doi: 10.1093/neuonc/nt035.
32. Naaman H., Rabinski T., Yizhak A., Mizrahi S., Avni Y.S., Taube R., Rager B., Weinstein Y., Rall G., Gopas J., Ofir R. Measles Virus Persistent Infection of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Reprogram.* 2018; 20(1): 17–26. doi: 10.1089/cell.2017.0034.
33. Yanagi Y., Takeda M., Ohno S., Hashiguchi T. Measles virus receptors. *Curr Microbiol Immunol.* 2009; 329: 13–30. doi: 10.1007/978-3-540-70523-9\_2.
34. Ulavov I.V., Tyler M.A., Zheng S., Han Y., Lesniak M.S. CD46 represents a target for adenoviral gene therapy of malignant glioma. *Hum Gene Ther.* 2006 May; 17(5): 556–64. doi: 10.1089/hum.2006.17.556.
35. Peng K.W., TenEyck C.J., Galanis E., Kalli K.R., Hartmann L.C., Russell S.J. Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Res.* 2002 Aug 15; 62(16): 4656–62.
36. Peng K.W., Fecteau S., Wegman T., O’Kane D., Russell S.J. Non-invasive in vivo monitoring of trackable viruses expressing soluble marker peptides. *Nat Med.* 2002 May; 8(5): 527–31. doi: 10.1038/nm0502-527.
37. Giannini C., Sarkaria J.N., Saito A., Uhm J.H., Galanis E., Carlson B.L., Schroeder M.A., James C.D. Patient tumor EGFR and PDGFRA gene amplifications retained in an invasive intracranial xenograft model of glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol.* 2005; 7(2): 164–76. doi: 10.1215/S1152851704000821.
38. Myers R., Harvey M., Kaufmann T.J., Greiner S.M., Krempski J.W., Raffel C., Shelton S.E., Soeffker D., Zollman P., Federspiel M.J., Blanco M., Galanis E. Toxicology study of repeat intracerebral administration of a measles virus derivative producing carcinoembryonic antigen in rhesus macaques in support of a phase I/II clinical trial for patients with recurrent gliomas. *Hum Gene Ther.* 2008 Jul; 19(7): 690–8. doi: 10.1089/hum.2008.035.
39. Allen C., Paraskevakou G., Liu C., Iankov I.D., Msaouel P., Zollman P., Myers R., Peng K.W., Russell S.J., Galanis E. Oncolytic measles virus strains in the treatment of gliomas. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Feb; 8(2): 213–20. doi: 10.1517/14712598.8.2.213.
40. Singh S.K., Clarke I.D., Hide T., Dirks P.B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene.* 2004; 23(43): 7267–73. doi: 10.1038/sj.onc.1207946.

41. Zeppernick F., Ahmadi R., Campos B., Dictus C., Helmke B.M., Becker N., Lichter P., Unterberg A., Radlwimmer B., Herold-Mende C.C. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 1; 14(1): 123–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0932.
42. Bach P., Abel T., Hoffmann C., Gal Z., Braun G., Voelker I., Ball C.R., Johnston I.C., Lauer U.M., Herold-Mende C., Mühlebach M.D., Glimm H., Buchholz C.J. Specific elimination of CD133+ tumor cells with targeted oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 2013 Jan 15; 73(2): 865–74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2221.
43. Chinot O.L., Wick W., Mason W., Henriksson R., Saran F., Nishikawa R., Carpentier A.F., Hoang-Xuan K., Kavan P., Cernea D., Brandes A.A., Hilton M., Abrey L., Cloughesy T. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 20; 370(8): 709–22. doi: 10.1056/NEJMoa1308345.
44. Desjardins A., Gromeier M., Herndon J.E. 2nd, Beaubier N., Bolognesi D.P., Friedman A.H., Friedman H.S., McSherry F., Muscat A.M., Nair S., Peters K.B., Randazzo D., Sampson J.H., Vlahovic G., Harrison W.T., McLendon R.E., Ashley D., Bigner D.D. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med.* 2018; 379(2): 150–161. doi: 10.1056/NEJMoa1716435.
45. Geletneky K., Hajda J., Angelova A.L., Leuchs B., Capper D., Bartsch A.J., Neumann J.O., Schöning T., Hüsing J., Beelte B., Kiprianova I., Roscher M., Bhat R., von Deimling A., Brück W., Just A., Frehtman V., Löbhard S., Terletskaia-Ladwig E., Fry J., Jochims K., Daniel V., Krebs O., Dahm M., Huber B., Unterberg A., Rommelaere J. Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial. *Mol Ther.* 2017; 25(12): 2620–34. doi: 10.1016/j.yimthe.2017.08.016.
46. Kuo L., Godeke G.J., Raamsman M.J., Masters P.S., Rottier P.J. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol.* 2000 Feb; 74(3): 1393–406. doi: 10.1128/jvi.74.3.1393-1406.2000.
47. Yount B., Denison M.R., Weiss S.R., Baric R.S. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol.* 2002 Nov; 76(21): 11065–78. doi: 10.1128/jvi.76.21.11065-11078.2002.
48. Verheije M.H., Lamfers M.L., Würdinger T., Grinwis G.C., Geritsen W.R., van Beusechem V.W., Rottier P.J. Coronavirus genetically redirected to the epidermal growth factor receptor exhibits effective antitumor activity against a malignant glioblastoma. *J Virol.* 2009; 83(15): 7507–16. doi: 10.1128/JVI.00495-09.
49. Zhu Z., Gorman M.J., McKenzie L.D., Chai J.N., Hubert C.G., Prager B.C., Fernandez E., Richner J.M., Zhang R., Shan C., Tycksen E., Wang X., Shi P.Y., Diamond M.S., Rich J.N., Chheda M.G. Correction: Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J Exp Med.* 2017; 214(10): 3145. doi: 10.1084/jem.2017109309122017c.
50. Сосновцева А.О., Гриненко Н.Ф., Липатова А.В., Чумаков П.М., Чехонин В.П. Онколитические вирусы в терапии злокачественных глиом. *Биомедицинская химия.* 2016; 62(4): 376–390. [Sosnovceva A.O., Grinenko N.F., Lipatova A.V., Chumakov P.M., Chehonin V.P. Oncolytic viruses in the therapy of malignant gliomas. *Biomedical Chemistry.* 2016; 2(4): 373–390. (In Russian)].
51. Губанова Н.В., Гайтан А.С., Разумов И.А., Мордвинов В.А., Кривошапкин А.Л., Нетесов С.В., Чумаков П.М. Онколитические вирусы в терапии глиом. *Молекулярная биология.* 2012; 46(6): 874–886. [Gubanova N.V., Gajtan A.S., Razumov I.A., Mordvinov V.A., Krivoschapkin A.L., Netesov S.V., Chumakov P.M. Oncolytic viruses in the therapy of gliomas. *Molecular biology.* 2012; 46(6): 874–886. (in Russian)].

Поступила/Received 27.05.2019  
Принята в печать/Accepted 26.07.2019

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Кит Олег Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 1728-0329. Researcher ID (WOS): U-2241-2017. Author ID (Scopus): 55994103100. ORCID: 0000-0003-3061-6108.

**Игнатов Сергей Николаевич**, врач-нейрохирург, аспирант, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 1734-0303. ORCID: 0000-0001-8250-9617. E-mail: Ignatov\_Sergey@mail.ru.

**Златник Елена Юрьевна**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 4137-7410. Author ID (Scopus): 6603160432.

**Солдаткина Наталья Васильевна**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник отделения общей онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN: 8392-6679. ORCID: 0000-0002-0118-4935.

**Росторгуев Эдуард Евгеньевич**, кандидат медицинских наук, заведующий отделением нейроонкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 8487-9157. Author ID (Scopus): 57196005138. ORCID: 0000-0003-2937-0470.

**Сагакянц Александр Борисович**, кандидат биологических наук, доцент, руководитель лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 7272-1408. ORCID: 0000-0003-0874-5261.

**Бондаренко Елена Сергеевна**, младший научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 3117-4040. ORCID: 0000-0002-8522-1026.

**Ситковская Анастасия Олеговна**, заведующая лабораторией клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России» (г. Ростов-на-Дону, Россия). SPIN-код: 1659-6976. Researcher ID: E-7496-2018. Author ID (Scopus): 56381527400. ORCID: 0000-0002-6035-1756.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

**Кит Олег Иванович**: редактирование окончательного варианта статьи с внесением ценного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации.

**Игнатов Сергей Николаевич**: разработка концепции научной работы, сбор и обработка данных, составление черновика рукописи.

**Златник Елена Юрьевна**: разработка концепции научной работы, редактирование окончательного варианта статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Солдаткина Наталья Васильевна**: редактирование окончательного варианта статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.



**Росторгуев Эдуард Евгеньевич:** редактирование окончательного варианта статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Сагакянц Александр Борисович:** редактирование окончательного варианта статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Бондаренко Елена Сергеевна:** редактирование окончательного варианта статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

**Ситковская Анастасия Олеговна:** редактирование окончательного варианта статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

### **Финансирование**

*Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.*

### **Конфликт интересов**

*Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.*

## ABOUT THE AUTHORS

**Oleg I. Kit**, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, General Director of National Medical Research Center of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). Researcher ID (WOS): U-2241-2017. Author ID (Scopus): 55994103100. ORCID: 0000-0003-3061-6108.

**Sergey N. Ignatov**, Postgraduate, Oncology Department, National Medical Research Center of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0001-8250-9617. E-mail: Ignatov\_Sergey\_@mail.ru.

**Elena Yu. Zlatnik**, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Immunophenotyping Laboratory of Tumors, National Medical Research Center of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). Author ID (Scopus) 6603160432.

**Natalia V. Soldatkina**, MD, DSc, Senior Researcher, Department of General Oncology, National Medical Research Center of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-0118-4935.

**Eduard E. Rostorguev**, MD, PhD, Head of the Department of Neurooncology, National Medical Research Center of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). Author ID (Scopus): 57196005138. ORCID: 0000-0003-2937-0470.

**Alexander B. Sagakyants**, PhD, Associate Professor, Head of Immunophenotyping Laboratory of Tumors, National Medical Research Center of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0003-0874-5261.

**Elena S. Bondarenko**, Junior Researcher, Immunophenotyping Laboratory of Tumors, National Medical Research Center of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). ORCID: 0000-0002-8522-1026.

**Anastasiya O. Sitkovskaya**, Head of the Laboratory of Cell Technologies, National Medical Research Center of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). Researcher ID: E-7496-2018. Author ID (Scopus): 56381527400. ORCID: 0000-0002-6035-1756.

## AUTHOR CONTRIBUTION

**Oleg I. Kit:** critical revision for the important intellectual content, approval of the final version of the manuscript.

**Sergey N. Ignatov:** study conception, data collection, drafting of the manuscript.

**Elena Yu. Zlatnik:** study conception, critical revision for the important intellectual content.

**Natalia V. Soldatkina:** critical revision for the important intellectual content.

**Eduard E. Rostorguev:** critical revision for the important intellectual content.

**Alexander B. Sagakyants:** critical revision for the important intellectual content.

**Elena S. Bondarenko:** critical revision for the important intellectual content.

**Anastasiya O. Sitkovskaya:** critical revision for the important intellectual content.

### **Funding**

*This study required no funding.*

### **Conflict of interest**

*The authors declare that they have no conflict of interest.*