

Вирус Зика обладает онколитической активностью в отношении клеток U87 глиобластомы человека

В.А. Святченко¹✉, И.А. Разумов^{1, 2}, Е.В. Протопопова¹, А.В. Демина¹, О.И. Соловьева², Е.Л. Завьялов², В.Б. Локтев^{1, 2}

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Глиобластома – высокозлокачественная опухоль головного мозга. Виротерапия с использованием онколитических вирусов начинает широко использоваться в клинической практике для лечения злокачественных опухолей человека. Целью настоящей работы было исследование возможных онколитических свойств вируса Зика в отношении глиобластомы человека. В экспериментах *in vitro* показано, что вирус Зика способен избирательно лизировать опухолевые клетки глиобластомы человека U87 MG, индекс селективности (отношение инфекционного титра для опухолевых клеток к титру на нормальных нетрансформированных клетках) равнялся $2 \cdot 10^2$. Избирательность репликативной активности вируса Зика в отношении клеток глиобластомы U87 MG дополнительно подтверждена методом непрямой иммунофлуоресценции. На иммунодефицитных SCID мышках с привитыми подкожными ксенографтами глиобластомы человека U87 MG показана выраженная противоопухолевая активность вируса Зика при проведении курса (ежедневно, в течение 4 дней) интратуморального введения $5 \cdot 10^5$ ТЦД₅₀ вируса Зика. Рост опухоли ингибировался более чем в 10 раз, вплоть до полного ее исчезновения. Индекс торможения роста опухоли составил 92.63 %. Рецидивов (метастазов) повторного роста опухоли не зарегистрировано в течение 64 сут наблюдения. Представленные в настоящей работе результаты показывают перспективность дальнейших исследований вируса Зика как потенциального онколитического агента против глиобластомы человека.

Ключевые слова: вирус Зика; виротерапия; глиобластома U87; ксенотрансплантация.

Zika virus has an oncolytic activity against human glioblastoma U87 cells

V.A. Svyatchenko¹✉, I.A. Razumov^{1, 2}, E.V. Protopopova¹, A.V. Demina¹, O.I. Solovieva², E.L. Zavjalov², V.B. Loktev^{1, 2}

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Glioblastoma is a highly lethal brain cancer. Virotherapy with the use of oncolytic viruses has since recently been regarded as a promising approach for the clinic treatment of human glioblastomas. The purpose of this work was to perform a primary evaluation of the Zika virus as a potential oncolytic agent against glioblastomas. *In vitro* experiments showed that the Zika virus strain MR 766 is able to selectively infect and lyse neoplastic cells of the human glioblastoma cell line U87 MG. The selectivity index (SI, the ratio of infectious titer for tumor cells to titer on normal untransformed cells) was $2 \cdot 10^2$. The selectivity of the replicative activity of Zika virus in relation to U87 MG glioblastoma cells was additionally confirmed by indirect immunofluorescence. Using the model of immunodeficient SCID mice with subcutaneous xenografts of human glioblastoma U87 MG, a strong antitumor activity of the Zika virus under a course (daily for 4 days) of intratumoral administration of $5 \cdot 10^5$ TCID₅₀ of Zika virus was shown. Treatment with Zika virus resulted in more than a 10-fold reduction in mean volumes of tumors. The tumor growth inhibition index was 92.63 %. Recurrences (metastases) of tumor re-growth were not registered within 64 days of observation. This result demonstrated the prospect of further in-depth studies of the Zika virus as a potential oncolytic agent against human glioblastomas.

Key words: Zika virus; virotherapy; glioblastoma U87 MG; xenotransplantation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Святченко В.А., Разумов И.А., Протопопова Е.В., Демина А.В., Соловьева О.И., Завьялов Е.Л., Локтев В.Б. Вирус Зика обладает онколитической активностью в отношении клеток U87 глиобластомы человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1040-1045. DOI 10.18699/VJ18.448

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Svyatchenko V.A., Razumov I.A., Protopopova E.V., Demina A.V., Solovieva O.I., Zavjalov E.L., Loktev V.B. Zika virus has an oncolytic activity against human glioblastoma U87 cells. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1040-1045. DOI 10.18699/VJ18.448 (in Russian)

Глиобластома человека играет ведущую роль среди злокачественных опухолей головного мозга. Использование традиционных методов лечения онкологических заболеваний: лучевой терапии, химиотерапии и хирургического удаления опухоли, а также их комбинаций – обладает весьма низкой эффективностью (Stupp et al., 2009). Обычно продолжительность жизни пациентов после постановки диагноза составляет менее двух лет. Одна из причин такой неэффективности традиционных методов лечения глиобластом – выраженная гетерогенность опухоли. В ткани опухоли обнаруживают нетрансформированные и опухолевые клетки, а также популяцию стволовых опухолевых клеток глиобластомы (glioblastoma stem cells – GSCs) (Chen et al., 2012). По всей вероятности, GSC определяют высокий уровень злокачественности опухоли у человека. Стволовые клетки обеспечивают высокий уровень клеточной пролиферации, формирование сосудов при быстром росте опухоли и ее инвазивный потенциал (Bao et al., 2006; Alvarado et al., 2017). Обычно глиобластомы редко метастазируют за пределы центральной нервной системы, а у большинства пациентов после хирургического вмешательства выявляются рецидивы опухоли в пределах 2–3 см от исходной полости резекции (Wallner et al., 1989). Эта особенность глиобластом предполагает возможную перспективность локальных методов противоопухолевой терапии, включая применение онколитических вирусов (Alonso et al., 2012; Kaufmann, Chiocca, 2014; Miska et al., 2016; Cassady et al., 2017; Cattaneo, Russell, 2017; Shchelkunov et al., 2018). Принято считать, что эффективность виротерапии зависит от способности вирусов специфично инфицировать и лизировать опухолевые клетки в организме и обеспечивать формирование противоопухолевого иммунитета (Cattaneo, Russell, 2017).

Вirus Зика является представителем рода *Flavivirus* (семейство *Flaviviridae*), который включает более 53 видов РНК-содержащих вирусов (Simmonds et al., 2017). Многие из них вызывают различные заболевания человека: лихорадку денге, лихорадку Западного Нила, желтую лихорадку и ряд других вирусных инфекций. Вirus Зика был открыт в 1948 г. и долгое время считался непатогенным для человека. Недавняя вспышка заболевания лихорадкой Зика в Бразилии и ассоциированные с ней случаи микроцефалии новорожденных стимулировали исследования этого вируса (Garcez et al., 2016; Lazear et al., 2016; Li et al., 2016; Ming et al., 2016; Qian et al., 2016; Shan et al., 2016). Было установлено, что вирус Зика инфицирует клетки-предшественники центральной нервной системы эмбриона, что сопровождается потерей способности клеток к пролиферации, дифференцировке и их последующей гибели. Для взрослого организма, напротив, вирус Зика малопатогенен: приблизительно в 80 % случаев он вызывает бессимптомную инфекцию, а в большинстве остальных случаев вызывает легкую лихорадку, не требующую лечения. Это послужило основанием для исследования онколитической активности вируса Зика против стволовых клеток глиобластомы (Zhu et al., 2017). Удалось обнаружить онколитическую активность адаптированного к мышам вируса Зика на мышинных моделях с использованием клеток глиобластомы.

Цель настоящей работы – исследование способности вируса Зика к избирательному инфицированию и лизису клеток глиобластомы человека U87 MG *in vitro* и его противоопухолевой активности *in vivo*, на модели ксенотрансплантации клеток U87 MG иммунодефицитным мышам SCID с последующим введением вируса Зика в опухоль.

Материалы и методы

Клеточные линии. В работе использовали: культуру опухолевых клеток глиобластомы человека U87 MG (ATCC HTB 14), культуры клеток почки эмбриона зеленой мартышки Vero E6 (ATCC CRL-1586) и почки эмбриона человека HEK293A (TermoFisher R70507), диплоидную нетрансформированную эпителиальную культуру клеток легких эмбриона человека MRC5 (ATCC CCL 171). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10 % фетальной сыворотки (Invitrogen), 80 мкг/мл гентамицина сульфата при 37 °C в культуральных пластиковых флаконах (Costar). Для снятия клеток с субстрата применяли 0.25 % раствор трипсина и 0.02 % раствор Версена в соотношении 1:1.

Вirus Зика штамм MR766 (ATCC® VR-84™) культивировали на монослойной культуре клеток Vero E6. При достижении 85–90 % цитопатогенного воздействия вируса на клеточную культуру собирали культуральную среду и осветляли центрифугированием (1500 g, 10 мин), после чего вирус очищали с использованием центрифужных концентраторов Vivaspin 20 (Sartorius Stedim Biotech). Инфекционную активность вируса в полученных вирус-содержащих суспензиях определяли на культуре клеток Vero E6 микрометодом согласно (Chanas et al., 1976).

Исследование селективной репликативной и литической активности вируса Зика *in vitro*. Культуры опухолевых (U87 MG), перевиваемых (Vero E6 и HEK 293A), а также нормальных нетрансформированных (MRC5) клеток человека, культивируемые на 96-луночных культуральных планшетах, инфицировали стандартными десятикратными разведениями вируса Зика. Инфицированные клетки инкубировали 6 сут при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Регистрацию цитолитического (цитопатического) эффекта на клетки осуществляли с использованием МТТ-теста (Niks, Otto, 1990). Литическую активность вируса в отношении опухолевых и нормальных клеток выражали через ТЦД₅₀/мл (50 % тканевая цитопатогенная доза).

Для подтверждения способности вируса Зика к избирательной репликации в клетках глиобластомы использовали метод непрямой иммунофлуоресценции. Субконфлюентные культуры U87 MG и MRC5, культивируемые в 24-луночных культуральных планшетах, инфицировали с множественностью 0.1 ТЦД₅₀/кл. Инфицированные клетки инкубировали 6 сут, после чего фиксировали охлажденным до –20 °C 70 % этанолом. Неспецифическое связывание блокировали посредством добавления блокирующего буфера (1 % БСА, 0.1 % Твин-20 в ФСБ) с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 1 ч. После удаления блокирующего буфера добавляли специфические к вирусу Зика мышинные иммуноглобулины в разведении 1:500 и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После двукратной промывки

блокирующим буфером добавляли вторичные флуоресцентные антитела в разведении 1 : 500 (кроличий антимышиный IgG конъюгат, Alexa Fluor® 488, MolecularProbes, Eugene) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После двукратной промывки проводили учет результатов при помощи флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert.

Животные. Исследование выполнено на самцах мышшей линии SCID (SHO-*PrkdcscidHrhr*) SPF-статуса в возрасте 6–7 нед. Животные содержались в Центре генетических ресурсов лабораторных животных на базе ЦКП «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН однопольными семейными группами по 2–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы Opti Mice (Animal Care Systems) в контролируемых условиях, при температуре 22–26 °C, относительной влажности 30–60 % и световом режиме свет/темнота 14/10 с рассветом в 01:00. Корм Ssniff (Германия) и вода после обратного осмоса, обогащенная минеральной смесью «Северянка» (Санкт-Петербург), животным предоставлялись *ad libitum*. В течение эксперимента состояние мышшей регистрировали ежедневно. В частности, оценивали изменения состояния кожных покровов, двигательной активности и поведения. Если мышшь демонстрировала выраженные признаки токсичности, например изогнутость, сгорбленность, снижение активности, и потерю массы тела более 20 %, то эти особи подвергались эвтаназии в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным. Запланированную эвтаназию осуществляли передозировкой CO₂, сопровождаемой цервикальной дислокацией.

За 2–3 нед до начала эксперимента культуру клеток глиомы U87 MG (ATCC HTB 14), которая хранится в криобанке ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН в жидком азоте, размораживали и культивировали в течение 5–7 пассажей на среде DMEM/F12 (1:1) с 10 % фетальной сыворотки (Invitrogen). Перед инъекцией клетки опухоли снимали с подложки раствором трипсин/версен и после 5 мин центрифугирования при 1 000 об/мин осадок тщательно ресуспендировали в среде без сыворотки, доводя до концентрации 100 тыс. клеток в 1 мкл или 10⁸ клеток в 1 мл. Для получения солидной опухоли глиомы U87 мышам в лопаточную область подкожно вводили по 10 млн клеток в объеме 100 мкл среды DMEM/F12 без сыворотки.

Противоопухолевую активность вируса Зика *in vivo* определяли на базе ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в условиях BSL-3. Животных содержали в микроизоляторах, расположенных в потоке стерильного воздуха на полках чистой комнаты Duo-Flo Unit, model H-5500, Labproducts Inc. Все экспериментальные процедуры с животными, а также манипуляции по смене подстилки и кормов проводили в кабинете биобезопасности 2-го класса Steril GARDIII Advance model SG603. По достижении опухолями объемов 80–90 мкл обрабатывали мышшей испытываемым штаммом вируса Зика. Вирус вводили курсом из четырех ежедневных инъекций, интратуморально в дозе 5 · 10⁵ ТЦД₅₀ в 50 мкл. Мышам контрольной группы интратуморально вводили физраствор в том же объеме – 50 мкл. Привитые опухоли измеряли штангельциркулем один раз в четыре дня, объем опухолей рассчитывали по формуле: (длина × ширина × высота)/2. Регистрировали динамику роста привитых опухолей и клинические про-

явления. Через 64 дня с начала цикла интратуморальной обработки мышшей подвергали эвтаназии в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным, опухоли резецировали с последующим взвешиванием и фотографированием.

Результаты и обсуждение

Исследование потенциальной способности штамма MR766 вируса Зика к избирательной репликации и лизису клеток глиобластомы человека *in vitro* проводили в сравнительных экспериментах с использованием опухолевой клеточной линии U87 MG и нормальной нетрансформированной диплоидной культуры клеток MRC5 человека. Высокочувствительные к вирусу Зика перевиваемые клеточные линии Vero E6 и HEK293A использовали в качестве контрольных клеточных культур. Как видно из результатов, представленных в таблице, штамм MR766 вируса Зика проявил сходную инфекционную активность как в отношении клеток глиобластомы U87 MG, так и в отношении immortalized клеточных линий, широко используемых для его культивирования в лабораторной практике. В то же время вирус Зика со значительно меньшей эффективностью инфицировал и лизировал нормальные диплоидные клетки человека MRC5. Индекс селективности (отношение инфекционного титра для опухолевых клеток и перевиваемых трансформированных клеток к титру на нормальных нетрансформированных клетках) U87 MG/MRC5 составил 2 · 10².

Для дополнительного подтверждения избирательности инфекционной активности вируса Зика в отношении клеток глиобластомы U87 MG применяли метод непрямой иммунофлуоресценции. С этой целью монослой клеточных линий U87 MG и MRC5 инфицировали с множественностью 0.1 ТЦД₅₀/кл вируса Зика, инкубировали в течение 6 сут, после чего проводили анализ с использованием специфических антивирусных мышшиных иммуноглобулинов и антивидового IgG конъюгата Alexa Fluor® 488 (рис. 1). Как видно, на инфицированной клеточной культуре глиобластомы наблюдается выраженная флуоресценция и отмечается ее полное отсутствие на инфицированных клетках MRC5. Эти результаты свидетельствуют о том, что при низкой множественности вирус Зика не способен эффективно инфицировать нормальные диплоидные клетки человека, но в то же время демонстрирует высокую репликативную активность в опухолевых клетках глиобластомы U87 MG.

С целью исследования противоопухолевой активности вируса Зика *in vivo* использовали иммунодефицитных мышшей линии SCID с привитыми подкожными ксенографтами глиобластомы человека. В ксенографты U87 MG, по достижении пальпируемых размеров (80–90 мкл), четырехкратно (ежедневно, 1 раз/сут) вводили суспензию вируса Зика в дозе 5 · 10⁵ ТЦД₅₀/мышшь. Контрольным мышам по той же схеме интратуморально инъецировали физраствор. На рис. 2 представлена динамика изменений средних объемов контрольных опухолей (*n* = 5) и опухолей, обработанных вирусом Зика (*n* = 5). Вирус Зика эффективно ингибировал развитие и рост привитых опухолей U87 MG, и на 24-е сутки с момента первой интратуморальной инъекции различие размеров опухолей в контрольной

Оценка онколитической активности вируса Зика *in vitro*

Клеточная культура	U87 MG	Vero E6	HEK293A	MRC5
Титр, ТЦД ₅₀ /мл	$2 \cdot 10^5$ ($8 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^5$)*	$5 \cdot 10^5$ ($2 \cdot 10^5$ – $1.2 \cdot 10^6$)	$2 \cdot 10^5$ ($7 \cdot 10^4$ – $6.5 \cdot 10^5$)	10^3 ($6 \cdot 10^2$ – $2.5 \cdot 10^3$)
Индекс селективности	200	500	200	–

* Доверительный интервал средних значений инфекционных титров, определенных в трех независимых экспериментах ($p < 0.05$).

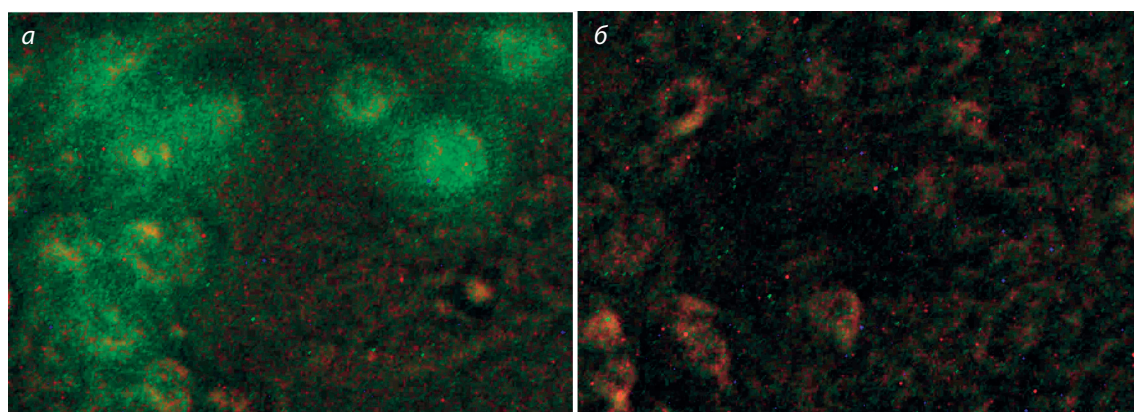


Рис. 1. Иммунофлуоресцентное окрашивание инфицированных вирусом Зика клеточных культур (6 сут после инфицирования с множественностью 0.1 ТЦД₅₀/кл): а – U87 MG; б – MRC5.

группе и группе с обработкой вирусом Зика становилось достоверным ($Z = 2.40227$, $p < 0.05$, тест Манна – Уитни). Было зарегистрировано более чем десятикратное снижение их средних объемов по сравнению с контрольными опухолями на момент завершения срока наблюдения через 64 сут от начала эксперимента ($Z = 2.50672$, $p < 0.05$, тест Манна – Уитни). Индекс торможения роста опухоли (ТРО) составил 92.63 %. У одного животного к окончанию срока наблюдения была обнаружена полная регрессия опухоли. Развитие отдаленных метастазов на период проведения эксперимента не зарегистрировано. После проведения эвтаназии подкожные ксенографты были резецированы, взвешены и сфотографированы (см. рис. 2). Средняя масса опухолей контрольных животных составила 6.51 ± 1.55 г, а опытной группы – 0.52 ± 0.30 г ($Z = 2.50672$, $p < 0.05$, тест Манна – Уитни).

Следует отметить, что указанный уровень противоопухолевой эффективности интратуморального введения вируса Зика был достигнут при использовании низкой дозы вируса ($5 \cdot 10^5$ ТЦД₅₀ на инъекцию). Вполне вероятно, что при использовании более высоких доз (10^7 – 10^8 ТЦД₅₀) будет достигаться более эффективная репликация вируса в клетках опухоли, что в итоге может привести к лизису клеток глиобластомы и полной регрессии всех привитых ксенографтов глиобластомы. Известно, что вирус Зика способен длительно персистировать в инфицированном организме, в том числе и в клетках нервной системы (Swartwout et al., 2017). Данное свойство вируса Зика может обеспечивать длительный контроль над развитием глиобластомы или появлением рецидивов этой опухоли. Об этом косвенно свидетельствует факт отсутствия

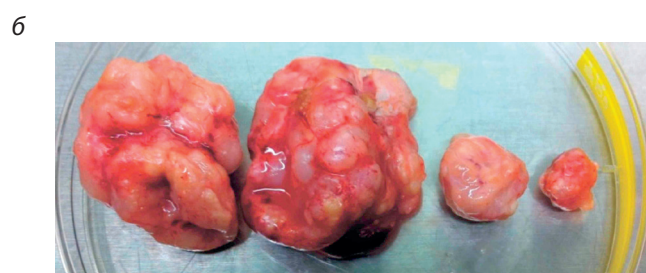
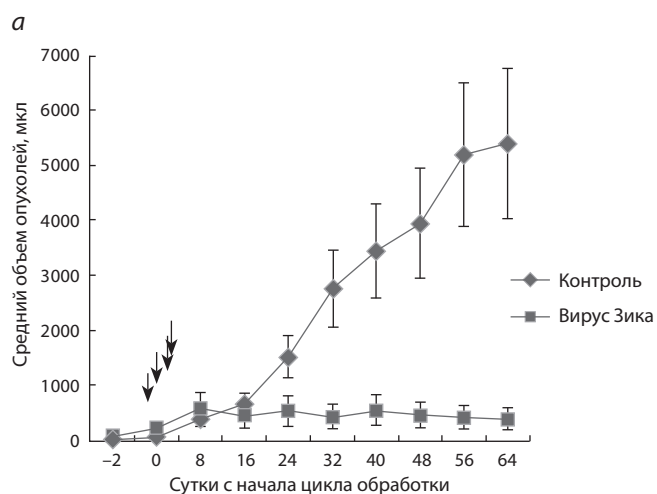


Рис. 2. Онколитическая эффективность вируса Зика в отношении мышинных ксенографтов глиобластомы U87 MG при интратуморальном введении: а – динамика изменений средних объемов опухолей; б – резецированные ксенографты на 64-е сутки после начала виро-терапии (слева – двух контрольных животных, справа – двух опытных животных).

дальнейшего развития опухоли на протяжении 64 сут эксперимента после проведения однократного цикла виротерапии вирусом Зика.

В работе (Zhu et al., 2017) указано, что вирус Зика (на примере штаммов Dakar 1984 и Brazil 2015) инфицирует *in vitro* дифференцированные клетки глиобластомы с меньшей эффективностью, чем стволовые опухолевые клетки глиобластомы. Представленные нами данные показывают, что вирус Зика обладает выраженным онколитическим потенциалом против дифференцированной клеточной линии глиобластомы U87 MG человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Онколитическая активность вируса Зика в отношении GSC и дифференцированных опухолевых клеток положительно характеризует возможный терапевтический потенциал вирус Зика против глиобластомы человека. Помимо этого, недавно была показана высокая противоопухолевая активность вируса Зика в отношении клеток нейробластомы человека (Mazar et al., 2018). В этой работе приведены данные, свидетельствующие о рецепторном взаимодействии вируса Зика с клеточным поверхностным гликопротеином CD24, и экспериментально доказана зависимость инфекционности вируса Зика для клеток от уровня презентации CD24 на клеточной поверхности.

Таким образом, представленные в настоящей работе результаты предполагают перспективность продолжения исследований вируса Зика как онколитического агента против глиобластом человека. В дальнейшем планируется исследовать противоопухолевую активность вируса Зика с использованием ортотопической модели мышинных ксенотрансплантатов глиобластом человека при интратуморальном и парентеральном введении, а также провести углубленное доклиническое исследование безопасности. Для снижения потенциальной нейротоксичности вируса Зика возможно внесение в его геном генетических модификаций. К настоящему времени картированы перспективные в этом отношении точечные мутации в 3'-нетранслируемом регионе и гене белка NS5 (Akiyama et al., 2016). В связи с последним надо отметить, что среди исследователей формируется мнение о достаточной безопасности и потенциальной перспективности использования для терапии глиобластом и нейробластом диких (генетически не модифицированных) штаммов вируса Зика, обусловленное высокой специфичностью вируса к опухолеобразующим и опухолевым клеткам и тем, что инфекция взрослых и детей протекает преимущественно бессимптомно и не вызывает выраженных патологических изменений как со стороны центральной нервной системы, так и со стороны организма в целом (Luplertlop et al., 2017; Mazar et al., 2018). Особенно большое значение это может иметь при поддерживающей терапии после операционного удаления глиобластом для предотвращения развития рецидивов опухоли.

Благодарности

Исследования поддержаны бюджетным проектом № 0324-2018-0016 и Российской федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (государственное задание ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора № 141-00069-18-01 от

17.03.2018); выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Akiyama B.M., Laurence H.M., Massey A.R., Costantino D.A., Xie X., Yang Y., Shi P.-Y., Nix J.C., Beckham J.D., Kieft J.S. Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science*. 2016;354:1148-1152. DOI 10.1126/science.aah3963.
- Alonso M.M., Jiang H., Gomez-Manzano C., Fueyo J. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. *Methods Mol. Biol.* 2012;797:111-125. DOI 10.1007/978-1-61779-340-0_9.
- Alvarado A.G., Thiagarajan P.S., Mulkearns-Hubert E.E., Silver D.J., Hale J.S., Alban T.J., Turaga S.M., Jarrar A., Reizes O., Longworth M.S. Glioblastoma cancer stem cells evade innate immune suppression of self-renewal through reduced TLR4 expression. *Cell. Stem. Cell*. 2017;20:450-461.e4. DOI 10.1016/j.stem.2016.12.001.
- 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;444:756-760. DOI 10.1038/nature05236.
- Cassady K.A., Bauer D.F., Roth J., Chambers M.R., Shoen T., Coleman J., Prichard M., Gillespie G.Y., Markert J.M. Pre-clinical assessment of C134, a chimeric oncolytic herpes simplex virus, in mice and nonhuman primates. *Mol. Ther. Oncolytics*. 2017;5:1-10. DOI 10.1016/j.omto.2017.02.001.
- Cattaneo R., Russell S.J. How to develop viruses into anticancer weapons. *PLoS Pathog.* 2017;13:e1006190. DOI 10.1371/journal.ppat.1006190.
- Chanas A.C., Johnson B.K., Simpson D.I. Antigenic relationships of alphaviruses by a simple micro-culture cross-neutralization method. *J. Gen. Virol.* 1976;32:295-300. DOI 10.1099/0022-1317-32-2-295.
- Chen J., Li Y., Yu T.S., McKay R.M., Burns D.K., Kernie S.G., Parada L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012;488:522-526. DOI 10.1038/nature11287.
- Garcez P.P., Loiola E.C., Madeiro da Costa R., Higa L.M., Trindade P., Delvecchio R., Nascimento J.M., Brindeiro R., Tanuri A., Rehen S.K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016;352:816-818. DOI 10.1126/science.aaf6116.
- Kaufmann J.K., Chiocca E.A. Glioma virus therapies between bench and bedside. *Neuro-Oncology*. 2014;16:334-351. DOI 10.1093/neuonc/not310.
- Lazear H.M., Govero J., Smith A.M., Platt D.J., Fernandez E., Miner J.J., Diamond M.S. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell. Host. Microbe*. 2016;19:720-730. DOI 10.1016/j.chom.2016.03.010.
- Li H., Saucedo-Cuevas L., Regla-Nava J.A., Chai G., Sheets N., Tang W., Terskikh A.V., Shrestha S., Gleeson J.G. Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. *Cell Stem Cell*. 2016;19:593-598. DOI 10.1016/j.stem.2016.08.005.
- Luplertlop N., Suwanmanee S., Muangkaew W., Ampawong S., Kitisin T., Poovorawan Y. The impact of Zika virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. *J. Vector Borne Dis.* 2017; 54(3):207-214. PMID 29097635.
- Mazar J., Li Y., Rosado A., Phelan P., Kedarinath K., Parks D., Alexander K., Westmoreland T. Zika virus as an oncolytic treatment of human neuroblastoma cells requires CD24. *PLoS One*. 2018;13(7): e0200358. DOI 10.1371/journal.pone.0200358.

- Ming G.L., Tang H., Song H. Advances in Zika virus research: Stem cell models, challenges, and opportunities. *Cell Stem Cell*. 2016; 19:690-702. DOI 10.1016/j.stem.2016.11.014.
- Miska J., Rashid A.I., Chang A.L., Muroski M.E., Han Y., Zhang L., Lesniak M.S. Anti-GITR therapy promotes immunity against malignant glioma in a murine model. *Cancer Immunol. Immunother.* 2016;65:1555-1567. DOI 10.1007/s00262-016-1912-8.
- Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods*. 1990;130:149-151. DOI 10.1016/0022-1759(90)90309-J.
- Qian X., Nguyen H.N., Song M.M., Hadiono C., Ogden S.C., Hammack C., Yao B., Hamersky G.R., Jacob F., Zhong C. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell*. 2016;165:1238-1254. DOI 10.1016/j.cell.2016.04.032.
- Simmonds P., Becher P., Buch J., Gould E. ICTV Virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *J. Gen. Virol.* 2017;98(1):2-3. DOI 10.1099/jgv.0.000672.
- Shan C., Xie X., Muruato A.E., Rossi S.L., Roundy C.M., Azar S.R., Yang Y., Tesh R.B., Bourne N., Barrett A.D. An infectious cDNA clone of Zika virus to study viral virulence, mosquito transmission, and antiviral inhibitors. *Cell Host Microbe*. 2016;19:891-900. DOI 10.1016/j.chom.2016.05.004.
- Shchelkunov S.N., Razumov I.A., Kolosova I.V., Romashchenko A.V., Zavjalov E.L. Virotherapy of the malignant U87 human glioblastoma in the orthotopic xenotransplantation mouse SCID model. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018;478(1):30-33. DOI 10.1134/S1607672918010088.
- Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., van den Bent M.J., Taphoorn M.J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:459-466. DOI 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- Swartwout B.K., Zlotnick M.G., Saver A.E., McKenna C.M., Bertke A.S. Zika virus persistently and productively infects primary adult sensory neurons *in vitro*. *Pathogens*. 2017;6(4). pii E49. DOI 10.3390/pathogens6040049.
- Zhu Z., Gorman M.J., McKenzie L.D., Chai J.N., Hubert C.G., Prager B.C. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* 2017;214(10):2843-2857. DOI 10.1084/jem.20171093.

ORCID ID

V.A. Svyatchenko orcid.org/0000-0002-2729-0592

I.A. Razumov orcid.org/0000-0002-6756-1457

E.V. Protopopova orcid.org/0000-0002-2782-8364

A.V. Demina orcid.org/0000-0002-9345-8787

O.I. Solovieva orcid.org/0000-0002-8218-2690

E.L. Zavjalov orcid.org/0000-0002-9412-3874

V.B. Loktev orcid.org/0000-0002-0229-321X