

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЧЕРНОРЫЖ

Яна Юрьевна

**УСТОЙЧИВОСТЬ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИНФИЦИРОВАННЫХ
ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА, К ДЕЙСТВИЮ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА ДОКСОРУБИЦИНА**

03.02.02. - Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Куш А.А.

Москва-2020 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. ЦИТОМЕГАЛОВИРУС ЧЕЛОВЕКА: СТРУКТУРА ВИРИОНА, ВИРУСНЫЙ ГЕНОМ И ФОРМЫ ИНФЕКЦИИ.....	16
1.1.1. СТРУКТУРА ВИРИОНА И ГЕНОМ ЦМВ.....	16
1.1.2. ЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ.....	18
1.1.2.1 Прикрепление и проникновение вируса в клетку.....	18
1.1.2.2 Сверхранняя стадия инфекции.....	19
1.1.2.3 Регуляция ранней стадии литической ЦМВ-инфекции.....	21
1.1.2.4 Регуляция поздней стадии литической ЦМВ-инфекции	23
1.1.3. ЛАТЕНТНАЯ ИНФЕКЦИЯ И РЕАКТИВАЦИЯ ЦМВ	24
1.1.4. ИНГИБИТОРЫ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ	28
1.2. ЦМВ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ.....	31
1.3. АНТИБИОТИК ДОКСОРУБИЦИН В ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТАМ.....	35
1.4. УЧАСТИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПУТЕЙ В АПОПТОЗЕ И В ВЫЖИВАНИИ КЛЕТОК ПРИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ.....	37
1.4.1. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ E2F1 И P73.....	37
1.4.1.1. Транскрипционный фактор E2F1.....	37
1.4.1.2. Семейство транскрипционных факторов p53 и белок p73.....	42
1.4.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПУТЬ PI3K/АКТ/MTOR И ЕГО РОЛЬ В КЛЕТОЧНОЙ ФИЗИОЛОГИИ.....	46
1.4.3 БИОГЕННЫЕ ПОЛИАМИНЫ И ИХ РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ КЛЕТОК.....	50
1.5. ВЛИЯНИЕ ЦМВ НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И АПОПТОЗ.....	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ.....	61
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	63
2.1. ОСНОВНЫЕ РЕАКТИВЫ.....	63

2.2. КЛЕТКИ.....	64
2.3. ОБРАБОТКА ДОКС КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ.....	64
2.4. ВИРУС.....	64
2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА.....	65
2.6. ИНФИЦИРОВАНИЕ ЦМВ КЛЕТОК ТНР-1.....	66
2.7. ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ЦМВ.....	66
2.8. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТА.....	67
2.9. АНАЛИЗ МРНК ВИРУСНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ ГЕНОВ МЕТОДОМ ОТ- ПЦР.....	68
2.10. ДНК-ДНК ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU.....	69
2.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННО АКТИВНОГО ВИРУСА В КЛЕТКАХ ТНР-1, ЗАРАЖЕННЫХ ЦМВ.....	70
2.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКС НА КЛЕТКИ ТНР-1.....	70
2.13. МТТ-ТЕСТ.....	71
2.14. ДЕТЕКЦИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКС НА ТНР-1 КЛЕТКИ, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦМВ.....	71
2.15. ВЫЯВЛЕНИЕ ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ДНК IN SITU....	72
2.16. ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА МЕТОДОМ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ.....	72
2.17. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.....	73
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦМВИ В КЛЕТКАХ ТНР-1.....	74
3.1. ВЛИЯНИЕ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ НА МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК ТНР-1.....	74
3.2. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ.....	75
3.3. ИЗМЕНЕНИЕ ДОЛИ КЛЕТОК ТНР-1, СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКИ ЦМВ, В ДИНАМИКЕ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ.....	75
3.4. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ ЦМВ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТА.....	77
3.5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДНК ЦМВ В ПОПУЛЯЦИИ ТНР-1 И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСНУЮ ДНК.....	78

3.6. ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСНЫХ ГЕНОВ В ДИНАМИКЕ ЦМВИ.....	80
3.7. ОТСУТСТВИЕ ИНФЕКЦИОННО АКТИВНОГО ВИРУСА В КЛЕТКАХ ТНР- 1, ЗАРАЖЕННЫХ ЦМВ.....	82
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ДОКС НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ, В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛА ПОЛИАМИНОВ И МОЛЕКУЛЯРНОГО ПУТИ МТОР.....	84
4.1. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКС НА КЛЕТКИ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦМВ.....	84
4.2. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ, ИСПОЛЬЗОВАВШИХСЯ В РАБОТЕ, НА КЛЕТКИ ТНР-1.....	86
4.3. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКС НА КЛЕТКИ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦМВ В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ МЕТАБОЛИЗМА ПОЛИАМИНОВ MDL72.527 И DFMO.....	91
4.4. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКС НА КЛЕТКИ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦМВ В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ МТОР - РАПАМИЦИНА И ТОРИНА2, И ИНГИБИТОРА РІЗК - LY294002.....	94
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ТНР-1 К ДОКС.....	100
5.1. ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДОКС В КЛЕТКАХ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ В ПРИСУТСТВИИ ГАНЦИКЛОВИРА.....	100
5.2. ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДОКС В КЛЕТКАХ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ В ПРИСУТСТВИИ DBA11.....	102
ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ДОКС НА ДНК И АПОПТОЗ КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ.....	104
6.1. ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ИНФИЦИРОВАННЫХ И НЕИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ТНР-1, ОБРАБОТАННЫХ ДОКС.....	104
6.2. ОЦЕНКА ДОЛИ КЛЕТОК ТНР-1, СОДЕРЖАЩИХ КАСПАЗЫ 3, 8 И 9 В ЦМВ ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДОКС.....	106

ГЛАВА 7. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ДОКС НА СОДЕРЖАНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ P73 И E2F1 В КЛЕТКАХ THR-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ И НЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ.....	109
7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОФОРМ БЕЛКА P73 TAP73 И DNP73 В КЛЕТКАХ THR- 1 ПРИ ЦМВИ И ОБРАБОТКЕ ДОКС.....	109
7.2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА E2F1 В КЛЕТКАХ THR-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ И ОБРАБОТАННЫХ ДОКС.....	111
ГЛАВА 8. ДЕЙСТВИЕ MDL72.527 НА ЭКСПРЕССИЮ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ И КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ В КЛЕТКАХ THR-1, ЗАРАЖЕННЫХ ЦМВ И ОБРАБОТАННЫХ ДОКС.....	112
8.1. ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА E2F1 В КЛЕТКАХ, ЗАРАЖЕННЫХ ЦМВ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДОКС В ПРИСУТСТВИИ MDL72.527.....	112
8.2. ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ TAP73/DNP73 ПОД ДЕЙСТВИЕМ MDL72.527.....	112
ГЛАВА 9. КОМБИНИРОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОКС И ИНГИБИТОРОВ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК THR-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ, К ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКА.....	114
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	117
ВЫВОДЫ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности.

ЦМВ, также обозначаемый как человеческий герпесвирус 5 (HHV-5), широко распространен в человеческой популяции, о чем свидетельствуют данные об обнаружении антител к ЦМВ у 40-95% населения в разных регионах мира [121]. ЦМВ инфекция (ЦМВИ) у иммунокомпетентных лиц редко вызывает клинически выраженные заболевания, тогда как у лиц с иммуносупрессией различной этиологии заражение ЦМВ может привести к поражениям различных органов и систем, стать причиной тяжелых заболеваний с неблагоприятным исходом [184]. Особенностью ЦМВИ является переход литической инфекции в латентную форму, которая позволяет вирусу пожизненно присутствовать в организме и реактивироваться под действием многочисленных внутренних и внешних факторов [172, 257]. Реактивация ЦМВ особенно опасна для беременных женщин и новорожденных детей [4, 16, 24], а также для ВИЧ-инфицированных пациентов [8] и лиц после трансплантации органов, и тканей [25].

В течение последних лет опубликованы данные об обнаружении вирусных генов в значительном количестве опухолей человека разного происхождения, в связи с чем возникает вопрос о роли вирусов в установлении резистентности к противоопухолевым антибиотикам. Одним из часто обнаруживаемых вирусов в опухолевых клетках является цитомегаловирус человека (ЦМВ) [77, 144, 261]. Проблема устойчивости к антибиотикам приобретает в последнее время все возрастающее значение не только для инфекционной патологии, но и для онкологии. Резистентность к противоопухолевым антибиотикам снижает эффективность лечения злокачественных новообразований и способствует возникновению метастазов. Причины возникновения резистентности активно изучаются многими исследователями [207], однако молекулярные и клеточные механизмы во многих случаях остаются не раскрытыми.

Недавно показана возможность реактивации латентного ЦМВ в клетках злокачественной гематологической опухоли – ТНР-1 [32, 266]. Клетки

моноцитарной лейкемии ТНР-1 представляют удобную модель для изучения клеточных и молекулярных механизмов взаимодействия вирусных и клеточных факторов в опухолевых клетках, приводящих к возникновению устойчивости к антибиотикам, среди которых широко применяется противоопухолевый препарат доксорубин (ДОКС).

Одним из возможных объяснений неэффективного действия ДОКС может быть антиапоптозная программа, которую запускает ЦМВ в зараженной клетке [222], что способствует выживанию опухолевых клеток, обработанных антибиотиком. Чувствительность к цитостатикам связана с активностью генов опухолевых супрессоров p53, в том числе, менее изученного белка этого семейства p73. Изоформы белка p73 могут оказывать как проонкогенное, так и антионкогенное действие [267]. Влияние ЦМВИ на изоформы p73 в опухолевых клетках ТНР-1 и действие ДОКС на экспрессию p73 в инфицированных клетках мало изучены. В то же время показано, что при ЦМВИ активируются молекулярные пути, включающие экспрессию транскрипционного фактора E2F1, который может оказывать как активирующее, так и ингибирующее действие на клеточные гены [170]. Представляло интерес выяснить влияние E2F1 на изоформы белка p73 и установить связь активности E2F1 с изменением чувствительности к ДОКС инфицированных ЦМВ клеток ТНР-1. Активность транскрипционных факторов E2F1 и p73 зависит от уровня метаболических процессов в опухолевых клетках, в том числе от уровня биогенных полиаминов. Биогенные полиамины участвуют в пролиферации и программированной гибели клеток, однако влияние ЦМВИ на цикл полиаминов в злокачественных гематологических опухолях и устойчивость к антибиотикам пока недостаточно изучены.

Недавние исследования продемонстрировали участие сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в регуляции ЦМВИ и показали, что ЦМВ модулирует молекулярный путь PI3K/Akt/mTOR в латентно инфицированных моноцитах [205].

Мы предположили, что воздействие на регуляцию биосинтеза полиаминов и путь PI3K/Akt/mTOR может сенсibilизировать лейкемические клетки ТНР-1, зараженные ЦМВ, к действию ДОКС.

Цель исследования.

Изучить влияние ЦМВ на устойчивость опухолевых клеток к препарату ДОКС, оценить роль транскрипционных факторов E2F1 и изоформ белка p73 в формировании резистентности к антибиотику, а также определить вклад молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR и биогенных полиаминов в поддержании устойчивости к ДОК

Задачи исследования:

1. Провести количественный анализ маркеров ЦМВ (вирусные ДНК, мРНК и белки) в клетках ТНР-1 в динамике ЦМВИ.
2. Оценить влияние ДОКС на жизнеспособность ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1 в разные сроки после заражения ЦМВ.
3. Изучить влияние ДОКС на повреждение ДНК и активацию каспаз 3, 8 и 9 в инфицированных и неинфицированных клетках ТНР-1.
4. Определить содержание изоформ белка p73 и транскрипционного фактора E2F1 в ЦМВ инфицированных и неинфицированных клетках ТНР-1 под действием ДОКС.
5. Оценить влияние ингибиторов метаболизма полиаминов: DFMO и MDL72.527 на жизнеспособность клеток, обработанных ДОКС в разные сроки ЦМВИ. Провести сравнительный анализ соотношения изоформ белка p73 и транскрипционного фактора E2F1 в клетках ТНР-1 в присутствии ингибиторов цикла полиаминов.
6. Изучить действие ингибиторов молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR на чувствительность клеток ТНР-1 к действию ДОКС инфицированных ЦМВ клеток при активной и латентной ЦМВИ.

7. Оценить возможность сочетанного использования ДОКС и ингибиторов клеточного метаболизма для восстановления чувствительности клеток ТНР-1 к антибиоту.

Научная новизна.

1. Впервые показано, что гемопозитические опухолевые клетки ТНР-1 устойчивы к противоопухолевому препарату ДОКС как при активной ЦМВИ при первичном заражении, так и при воздействии ДОКС на латентно инфицированные клетки лейкемии.

2. Установлено, что формирование устойчивости к ДОКС в клетках ТНР-1 ассоциируется с изменением соотношения изоформ белка p73 – увеличением содержания укороченной проонкогенной формы DNp73, а также со значительным увеличением содержания транскрипционного фактора E2F1.

3. Впервые показано участие внутриклеточных метаболических процессов цикла биогенных полиаминов и молекулярного пути PI3K/АКТ/mTOR в формировании резистентности к ДОКС клеток, инфицированных ЦМВ, в том числе в латентной фазе. Установлено, что подавление катаболизма полиаминов и ферментов пути mTOR восстанавливают чувствительность к ДОКС клеток моноцитарной лейкемии ТНР-1, инфицированных ЦМВ.

4. Установлено, что молекулярный механизм восстановления чувствительности к ДОКС под действием MDL72.527 включает активацию регуляторного пути E2F1/p73, что приводит к запуску апоптозной программы в инфицированных опухолевых клетках.

5. Впервые показано, что сочетанное применение ДОКС с ингибиторами метаболизма полиаминов и пути mTOR позволяет уменьшить концентрации использованных соединений в 2-4 раза при сохранении эффективности восстановления чувствительности клеток ТНР-1 к антибиоту.

Методология и методы исследования.

Методологической основой исследования послужили современные подходы к анализу теоретических проблем вирусологии и применение комплекса экспериментальных методов вирусологии. В работе использованы также актуальные методы молекулярной биологии, а также методы прикладной статистики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В клетках ТНР-1 активная ЦМВИ переходит в латентную фазу в течение 14 дней после заражения.
2. Клетки ТНР-1, инфицированные ЦМВ, устойчивы к действию ДОКС как при активной (24 ч после заражения), так и при латентной (7-14 сут) инфекции.
3. В активно инфицированных ЦМВ клетках ТНР-1 в 1,6 раз снижается количество разрывов ДНК под действием ДОКС, а также в 3,8 раза уменьшается количество клеток, содержащих маркеры апоптоза – активированные формы каспаз 3, 8 и 9, по сравнению с неинфицированными опухолевыми клетками.
4. В ЦМВ инфицированных клетках, обработанных ДОКС, отношение полноразмерной изоформы белка p73 TAp73 к укороченной изоформе DNp73 уменьшается в 1,8 раз по сравнению с неинфицированными ТНР-1, что ассоциируется с 6-кратным повышением содержания транскрипционного фактора E2F1.
5. Ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527 восстанавливает чувствительность ТНР-1 к ДОКС как при активной, так и при латентной ЦМВ инфекции. Восстановление чувствительности сопровождается увеличением соотношения TAp73/DNp73 и повышением уровня E2F1 в присутствии MDL72,527 в 9 раз по сравнению с уровнем контрольных клеток, обработанных ингибитором.

6. Преодоление резистентности к ДОКС ингибиторами молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR показано при воздействии как на активно инфицированные ЦМВ клетки ТНР-1, так и на латентно инфицированные опухолевые клетки.

7. Комбинированное применение ДОКС и ингибиторов метаболизма опухолевой клетки (цикла полиаминов и ферментов пути mTOR) позволяет уменьшить цитотоксические концентрации соединений и полностью восстановить чувствительность клеток лейкемии к ДОКС.

Степень достоверности результатов.

Достоверность полученных результатов обусловлена использованием достаточного объема фактического материала, применением адекватных поставленным задачам методов исследования и использованием современных методов статистической обработки экспериментальных данных.

Внедрение результатов исследования.

Полученные результаты диссертационной работы используются: кафедрой онкологии с усовершенствованием врачей ФГБОУ ВО ДГМУ Минздрава России при обучении студентов 5-6 курсов, интернов, клинических ординаторов и аспирантов; отделением гематологии ГБУ РД «Республиканской клинической больницы» для дополнительной диагностики цитомегаловирусной инфекции у пациентов с моноцитарной лейкемией резистентной к химиотерапии доксорубицином и применение рапамицина в комплексе терапии у пациентов с выявленной цитомегаловирусной инфекцией.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 3, п. 6 и п. 10 паспорта специальности 03.02.02 – «вирусология».

Декларация личного участия автора.

Все этапы работы выполнены автором лично. Самостоятельно проведен анализ и интерпретация полученных результатов; лично или при непосредственном участии автора подготовлены публикации по материалам исследования. Суммарное личное участие автора в работе составляет не менее 95%.

Апробация работы.

Основные результаты работы были представлены на следующих научных мероприятиях: XXIV международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов - 2017», 10-14 апреля, 2017, Москва; международная научная конференция «Клиническая протеомика. Постгеномная медицина» 30 октября - 1 ноября 2017, Москва; IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, 17-19 декабря 2018, Москва; XX международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке», 17-20 декабря 2018; международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» 18-22 июня 2019, Санкт-Петербург; VII международная научно-практическая конференция "Биотехнология: наука и практика" 18-20 сентября 2019, Севастополь, Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий», 8-11 октября 2019, Санкт-Петербург.

Публикации.

По результатам диссертационной работы опубликовано 12 работ: 6 статей, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК, а также 6 тезисов докладов в сборниках материалов российских и международных конференций.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Климова. Р. Р. Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах / Климова Р. Р., Момотюк Е. Д., Демидова Н. А., **Чернорыж Я. Ю.**, Коваль В. С., Иванов А. А., Жузе А. Л., Куш А. А. // Вопросы вирусологии. - 2017. – Т.62. - №4. - С.162-168

2. Емельянова С. С. Участие транскрипционных факторов E2F1 и p73 в формировании резистентности к доксорубину опухолевых клеток ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом человека. / Емельянова С. С., **Чернорыж Я. Ю.**, Юрлов К. И., Федорова Н. Е., Иванов А. В., Кочетков С. Н., Вербенко В. Н., Куш А. А., Виноградская Е. Р. // Цитология. – 2018. – Т.60. – №7. – С.527-530.

3. Fedorova N. E. Inhibitor of polyamine catabolism MDL72.527 restores the sensitivity to doxorubicin of monocytic leukemia THP-1 cells infected with human cytomegalovirus. / Fedorova N. E., **Chernoryzh Y. Y.**, Vinogradskaya G. R., Emelianova S. S., Zavalyshina L. E., Yurlov K. I., Zakirova N. F., Verbenko V. N., Kochetkov S. N., Kushch A. A., Ivanov A. V. // Biochimie. – 2019. – №158. – С.82-89.

4. **Чернорыж Я. Ю.** Резистентность клеток лейкемии ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом, к противоопухолевому антибиотику доксорубину и восстановление чувствительности ингибиторами молекулярного пути PI3K/АКТ/mTOR. / **Чернорыж Я. Ю.**, Федорова Н. Е., Юрлов К. И., Симонов Р. А., Корнев А. Б., Карпов Д. С., Закирова Н. Ф., Иванов А. В., Куш А. А., Гинцбург А. Л. // Доклады академии наук. – 2019. Т.489. – №4. – С.433–437.

5. **Чернорыж Я. Ю.** Ингибиторы mTOR снимают блок апоптоза, вызванный ЦМВ инфекцией опухолевых клеток ТНР-1, обработанных доксорубином. / **Чернорыж Я. Ю.**, Федорова Н. Е., Корнев А. Б., Иванов А. В., Куш А. А. // Вестник «Биомедицина и социология». – 2018. – Т.3. – №4. – С.45-48.

6. **Чернорыж Я. Ю.** Сочетанное применение противоопухолевого антибиотика доксорубина и ингибитора mTOR — рапамицина восстанавливает чувствительность клеток лейкемии ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом, и снижает цитотоксичность доксорубина. / **Чернорыж Я. Ю.**, Федорова Н. Е.,

Юрлов К. И., Иванов А. В., Куш А. А. // Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий»: Сб. трудов Конференции, Санкт-Петербург, 8-11 октября 2019 г. – Гены и клетки, 2019. – Т.14. – №3. – С.70.

7. **Чернорыж Я. Ю.** Негативное влияние цитомегаловируса на чувствительность опухолевых клеток ТНР-1 к действию противоопухолевого антибиотика доксорубицина. / **Чернорыж Я. Ю.**, Юрлов К. И. // XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»: Сб. трудов Конференции, Москва, 10-14 апреля 2017 г. – М.: МАКС Пресс, 2017.

8. Емельянова С. С. Ассоциация развития устойчивости опухолевых клеток ТНР-1 к химиотерапии под действием цитомегаловируса с изменением баланса изоформ белка p73. / Емельянова С. С., **Чернорыж Я.Ю.**, Юрлов К. И., Федорова Н. Е., Куш А. А., Иванов А. В., Кочетков С. Н., Вербенко В. Н., Виноградская Г. Р. // IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии: Сб. трудов Конференции, Москва, 17-19 декабря 2018 г. - М.: Успехи молекулярной онкологии, 2018 – С.146.

9. **Чернорыж Я. Ю.** Восстановление чувствительности к доксорубину лейкоэмических клеток ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом, под действием ингибитора полиаминов MDL72.527 / **Чернорыж Я. Ю.**, Закирова Н. Ф., Смирнова О. А., Емельянова С. С., Юрлов К. И., Федорова Н. Е., Виноградская Г. Р., Вербенко В. Н., Иванов А. В. // IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии: Сб. трудов Конференции, Москва, 17-19 декабря 2018 г. - М.: Успехи молекулярной онкологии, 2018 – С.105.

10. Виноградская Г. Р. Восстановление чувствительности к доксорубину инфицированных цитомегаловирусом клеток моноцитарной лейкемии ТНР-1 под воздействием ингибитора полиаминового катаболизма MDL 72.527 / Виноградская Г. Р., Федорова Н. Е., **Чернорыж Я. Ю.**, Емельянова С. С., Завалишина Л. Е., Юрлов К. И., Закирова Н. Ф., Вербенко В. Н., Кочетков С. Н., Куш А. А., Иванов А. В. // международный конгресс «VII съезд Вавиловского

общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы»: Сб. трудов Конференции, Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019 г. – СПб.: ВВМ, 2019 – С.793.

11. **Чернорыж Я. Ю.** Сверххранение белки цитомегаловируса участвуют в установлении резистентности к противоопухолевому антибиотику доксорубицину инфицированных клеток лейкемии ТНР-1 / **Чернорыж Я. Ю.**, Юрлов К. И., Симонов Р. А., Федорова Н. Е., Куш А. А. // VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика»: Актуальная биотехнология. – 2019. – Т.30. – №3. – С. 385-388.

12. Емельянова С. С. Цитомегаловирус индуцирует устойчивость опухолевых клеток ТНР-1 к химиотерапии, влияя на метаболизм полиаминов / Емельянова С.С., **Чернорыж Я. Ю.**, Юрлов К. И., Закирова Н. Ф., Виноградская Г. Р., Вербенко В. Н. // VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика»: Актуальная биотехнология. – 2019. – Т.30. – №3. – С.581-584.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 51 рисунок. Диссертационная работа включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение, а также заключение, выводы, список сокращений и список литературы, состоящий из 26 отечественных и 282 зарубежных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ЦИТОМЕГАЛОВИРУС ЧЕЛОВЕКА

Цитомегаловирус человека (ЦМВ) или герпесвирус человека 5 (HHV-5) – один из 8 членов семейства *Herpesviridae*, способных инфицировать человека, относится подсемейству *Betaherpesvirinae* и является типичным представителем рода *Cytomegalovirus* [197].

1.1.1. СТРУКТУРА ВИРИОНА И ГЕНОМ ЦМВ

ЦМВ имеет структуру, характерную для всех герпесвирусов (рисунок 1А).

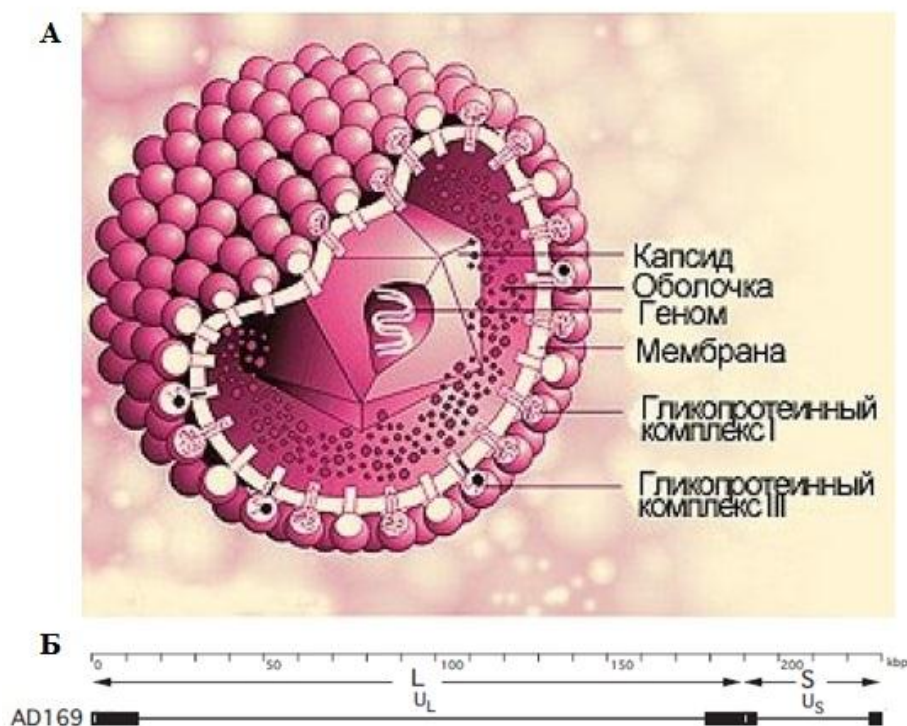


Рисунок 1. (А) Трехмерное изображение строения вириона ЦМВ представлено с легкими изменениями из книги *Fields virology* [197]. (Б) Схема соотношения длинных уникальных областей UL и коротких уникальных областей US на схеме структуры генома ЦМВ, блоками обозначены каждая из областей фланкирования, соответствующая повторяющимся последовательностям дана с легкими изменениями из книги *Fields virology* [197].

Диаметр вириона ЦМВ составляет 200-230 нм. Вирусная ДНК находится внутри высокостабильного капсида икосаэдрической формы, окруженного плотным аморфным слоем – тегументом (матриксом). Вирион покрыт двухслойной липопротеиновой оболочкой, которая содержит элементы мембраны клетки-хозяина и вирусные гликопротеины.

Линейный геном ЦМВ представлен двухцепочечной ДНК (дцДНК), размеры которой варьируют от 125 до 236 т.п.н., потенциально кодируя более 100 белков (рисунок 1Б). ДНК ЦМВ представлена уникальным длинным (UL) и уникальным коротким (US) компонентами. Длинный компонент фланкирован инвертированными повторами IRL и TRL, короткий компонент – IRS и TRS, которые частично дублируются набором сверххранних генов IRS1 и TRS1.

Геном ЦМВ богат парами пиримидиновых оснований, входящих преимущественно в состав прямых и инвертированных повторов [180].

Капсид вириона 15 нм имеет икосаэдрическую форму и состоит из 162 капсомеров. В его состав входят мажорный капсидный белок, кодируемый геном *UL86*, комплекс минорного капсидного белка (TR2, *UL85*), минорный капсид-связывающий белок (TR1, *UL46*) и малый капсидный белок (SCP, *UL48A*).

Тегумент представлен, по меньшей мере, 32 известными в настоящее время вирусными белками. Наиболее изученным белком тегумента в вирионе ЦМВ является pp65 (*UL83*). Тегумент содержит также белки pp71 (*UL82*), pp150 (*UL32*), и вирусную протеинкиназу (*UL97*), необходимую на начальной стадии инфекции, а также для созревания вирусных частиц. Большинство белков фосфорилируются и многие из них высоко иммуногенны. Члены семейства US22 могут модулировать передачу сигналов в клетках хозяина. Некоторые из них участвуют в программе клеточной гибели [209]. Оболочка вириона ЦМВ является производной цитоплазматической мембраны клетки-хозяина и мембраны эндосом, содержит более 20 гликопротеинов. Гликопротеины ассоциированы в комплексы, включающие gB (*UL55*), gM (*UL100*), gN (*UL73*), gH (*UL75*) и gL (*UL115*). Поверхностные белки являются главными мишенями для антител, среди которых некоторые нейтрализуют инфекционную активность вируса. Белки

оболочки усиливают инфекционный процесс в эпителиальных и эндотелиальных клетках и влияют на взаимодействие вируса с дендритными клетками, нейтрофилами и многими другими типами клеток иммунной системы. На основании исследований пентамерного комплекса белков, кодируемых *UL75*, *UL115*, *UL128*, *UL130*, *UL131A*, показано, что вирусные частицы, произведенные в одном типе клеток, могут различаться по биологическим характеристикам от вирусных частиц, полученных в других клетках.

1.1.2. ЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ

1.1.2.1. Прикрепление и проникновение вируса в клетку

Проникновение вируса в клетку включает в себя следующие этапы: связывание со специфическими рецепторами клеточной мембраны; слияние оболочки вируса с клеточной мембраной; транслокация нуклеокапсида к ядру с помощью компонентов цитоскелета, проникновение нуклеокапсида через ядерные поры и высвобождение вирусного генома в ядро.

ЦМВ проникает в моноциты благодаря взаимодействию ряда его поверхностных гликопротеинов gB, gH, gL, gO и UL128-131 [210] с рецепторами клеточной поверхности. Гликопротеин gB – один из наиболее изученных вирусных белков, взаимодействующих с рецепторами клеточной мембраны, установлена кристаллическая структура gB, который образует тример [59]. Гликопротеины gH и gL образуют два отдельных комплекса: тримерный gH/gL/gO или пентамерный gH/gL/UL128/UL130/UL131A. Тримерный комплекс необходим для проникновения вируса в фибробласты, тогда как пентамерный комплекс необходим для проникновения в эндотелиальные, эпителиальные, моноцитарные и дендритные клетки [240, 294].

В последнее время получены данные о том, что проникновение вируса в различные клетки происходит с использованием разных механизмов и с участием различных вирусных белков [280]. Вирионы ЦМВ активируют TLR, причем в

клетках разных типов репертуар используемых TLR неодинаков: в фибробластах – преимущественно TLR2, в клетках THP-1 – TLR2,4,9 [53]. При вхождении в фибробласты вирус взаимодействует с platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) [297], с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) [288]. Для проникновения в моноциты вирус использует β 1 и β 3 интегрины, запуская integrin/Src/paxillin путь, что обеспечивает интернализацию ЦМВ в моноциты [210].

Белки оболочки ЦМВ не проникают в клетку, вирус «раздевается» и внутрь клетки проникают белки тегумента и капсид. После проникновения нуклеокапсида ЦМВ в цитоплазму, он по цитоплазматическим микротрубочкам транслоцируется в ядро, где высвобождается вирусная ДНК. Белки тегумента pUL48 и pUL47 контролируют высвобождение вирусной ДНК из нуклеокапсида.

1.1.2.2. Сверххраня стадия инфекции

После проникновения генома ЦМВ в ядро начинается экспрессия сверххранних генов (*IE*). Регулирование экспрессии происходит с участием клеточных факторов и направлено как на внутриклеточную защиту от патогена, так и на размножение вируса. Клеточные факторы могут непосредственно влиять на транскрипцию путем связывания с элементами промотора/энхансера напрямую (транскрипционные факторы), либо через взаимодействие с другими белками (адаптерами) и/или путем влияния на хроматин. Один из механизмов – подавление экспрессии вирусных *IE* генов гистон-деацетилазой (HDACs), представляет внутренний защитный механизм клетки-хозяина, который должен обезвредить вирус до начала его продуктивной репликации.

Из комплекса сверххранних белков наиболее изучены IE1-p72 и IE2-p86, кодируемые *UL123* и *UL122* соответственно. Активность этих белков ослабляет эпигенетическую репрессию и индуцирует ранние и поздние (*E* и *L*) вирусные гены в ходе продуктивной репликации. Кроме того, IE белки ауторегулируют экспрессию главного сверххранного промотора (MIEP), а также устанавливают

ядерные участки, где продолжается синтез вирусной ДНК. Независимо от типа клеток, эпигенетическая репрессия МІЕР должна быть ослаблена согласованной и последовательной деятельностью тегументных белков, таких как pp71 и ppUL69, и основных ІЕ белков ІЕ1-p72 и ІЕ2-p86, которые с другими вирусными белками и транскрипционным аппаратом клетки-хозяина поддерживают экспрессию вирусного генома при его длинном цикле репликации. Некоторые ІЕ белки противодействуют внутриклеточным механизмам защиты, запускаемым вирусной инфекцией. ІЕ1-p72 связывается с хроматином и управляет STAT-сигналом (сигнал трансдукции и активатор транскрипции), а также разрушает ядерный домен 10 (ND10), что в дополнение к HDACs и Daхх способствует ремоделированию хроматина и прямой регуляции экспрессии генов [241, 286].

Один из ІЕ генов (*US3*) участвует в посттрансляционной модуляции генов МНС класса I, что помогает избежать цитотоксического действия Т-клеток. Не только ІЕ1 и ІЕ2, но также и другие ІЕ белки осуществляют регуляторные функции, внося вклад в развитие инфекции.

Освобождение от HDAC-репрессии первоначально осуществляется преимущественно с помощью тегументного белка pp71 (*UL82*), основного трансактиватора вириона (VTA) человеческого ЦМВ. VTA уменьшает HDAC-реессию, снижая Daхх/ATRХ-опосредованное предотвращение репрессии МІЕР. Эти свойства pp71 используются в экспериментальных условиях для увеличения продукции инфекционно активного вируса после трансфекции вирусной ДНК или бакмиды. Белок pp71 ассоциирован с тегументным белком ppUL35, являющегося модификатором реакции повреждения клеточной ДНК. После проникновения тегументный комплекс pp71: ppUL35 более эффективно стимулирует экспрессию МІЕР, чем автономный pp71, как в экспериментальных условиях, так и в контексте вирусной инфекции [175, 189].

Другие тегументные белки также способствуют оптимальной экспрессии МІЕР. ppUL69 усиливает начальные стадии вирусной инфекции, хотя имеет большое влияние и на поздних стадиях инфекции. ppUL26 является транскрипционным активатором МІЕР, который, вероятно, регулирует уровень

фосфорилирования других белков тегумента. Мажорный белок pp65 также взаимодействует с MIEP, необходим для экспрессии сверххранних генов и участвует в подавлении генов системы ИФН [51, 155].

В дополнение к вирусным белкам, на экспрессию MIEP влияют клеточные транскрипционные факторы различных молекулярных путей, участвующих в клеточном ответе на инфекцию, белки метаболических циклов, регуляторы клеточной пролиферации.

Основная функция сверххранних белков IE1-p72 и IE2-p86 – активация вирусных генов, экспрессируемых на последующих стадиях инфекции. IE1-p72 и IE2-p86 ассоциируются с внутриядерным доменом ND10. IE1-p72 разрушает этот домен и разрушает ND10-зависимую активацию интерферона (ИФН), одновременно участвуя в экспрессии вирусных генов и в инициации синтеза вирусной ДНК.

1.1.2.3. Регуляция ранней стадии литической ЦМВИ

После пика экспрессии сверххранних регуляторных белков, через 8-12 часов после инфицирования, транскрипционно активными становятся ранние *E* гены. Хотя некоторые генные продукты *E* синтезируются с начала заражения, большинство из 65 белков и мРНК накапливаются постепенно. Ранний период продолжается от 18 до 24 часов после инфицирования, когда иницируется синтез вирусной ДНК. Ранние гены имеют решающее значение для синтеза вирусной ДНК и выполняют несколько функций, которые становятся важными на поздних стадиях инфекции для созревания и выхода вирусных частиц.

Экспрессия ранних генов вызывает нарушение регуляторных путей клеточного цикла клетки-хозяина. Подробно изучены промоторные участки трех *E* генов (*UL112-UL113*, *UL54* и *UL4*). Четыре продукта, кодируемых *UL112-113* (pp34, pp43, pp50, pp84), функционируют совместно с IE1/IE2 и модулируют экспрессию ранних генов. *UL21A* усиливает репликацию вирусной ДНК на ранней стадии. Гены нескольких мажорных белков тегумента, в том числе pp65,

pp71, pp150 и LTP/ppUL48 транскрипционно активируются на ранней стадии инфекции, но их основное действие проявляется на более поздних стадиях, включая созревание вириона.

ЦМВ активирует экспрессию клеточного генома, наблюдается стимуляция клеточного метаболизма и энергетических путей в пользу репликации ЦМВ. ЦМВИ стимулирует синтез клеточных РНК и белков, одновременно нарушая клеточный цикл таким образом, что инфицированные неделящиеся клетки вступают в митотический цикл и проходят фазы G1, S, G2 в зависимости от стадии, на которой произошло заражение [23]. Вероятно, это происходит в результате нарушения регуляции клеточных циклин-зависимых киназ и дислокации белков, обычно ассоциированных с участками вирусного созревания в цитоплазме. Нарушения клеточного цикла под действием ЦМВ зависят от типа зараженных клеток. В фибробластах синтез клеточной ДНК обычно блокируется при участии IE2-p86 и тегументных белков pp71 и ppUL69. Кроме того, описаны и другие белки ЦМВ, участвующие в подавлении клеточного цикла на разных его стадиях [264].

Синтез ДНК ЦМВ при литической инфекции происходит в ядре, в инфицированных фибробластах он начинается через 14-16 часов после заражения, увеличивается к 24 часам, достигая более 10000 копий вирусных ДНК на клетку. В фибробластах созревшие вирионы покидают клетку через цитоплазму в течение следующих 24-48 часов. В эпителиальных клетках и клетках астроцитомы репликация вируса менее продуктивна, и максимальные уровни ДНК не превышают 1000 копий вирусных геномов на клетку. Для репликации ДНК ЦМВ необходимы 6 основных белков, которые высоко консервативны среди *Herpesviridae* [54] и составляют реплисому: ДНК-полимераза и его процессивный фактор (UL54 и UL44); белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК (UL57), и гетротримерный геликаза-праймазный комплекс (UL70, UL105, UL102). Кроме того, в трансфицированных клетках в репликации ДНК ЦМВ могут участвовать дополнительно ряд вирусных генов [251].

1.1.2.4. Регуляция поздней стадии литической ЦМВИ

Экспрессия *L* генов ЦМВ максимальна после начала репликации вирусной ДНК. В фибробластах, спустя 24 часа после инфицирования, как правило, определяются точки разделения между *E* и *L* фазами инфекции. Следует отметить, что экспрессия части *E* генов продолжается в течение *L* фазы. Кроме того, темп транскрипции и набор транскрибируемых генов зависят от типа клетки. Поздние гены управляют созреванием капсида, инкапсидированием вирусной ДНК, созреванием вириона и выходом из клетки. К *L* фазе инфекции клетки хозяина существенно изменяются под действием вирусных генов. Образуются большие ядерные включения, которые содержат реплицированную вирусную ДНК и капсиды, а также компоненты цитоплазмы, где происходит окончательное формирование вирусной частицы и выход из клетки.

Основные особенности сборки капсида ЦМВ и капсидирования ДНК являются общими для всех герпесвирусов. В процессе созревания вируса участвуют вирусные и клеточные ферменты, в том числе протеинкиназы, протеазы и терминазы [71, 129]. Сборка начинается в ядре, где вновь синтезированная вирусная ДНК упаковывается в заранее синтезированный капсид, и завершается, когда нуклеокапсиды получают оболочку из цитоплазматической мембраны. Тегументные белки добавляются к нуклеокапсиду сначала в ядре и затем в цитоплазме, где нуклеокапсиды покрываются мембраной. Вирусный белок UL104 обеспечивает канал для капсидирования вирусной ДНК. В формировании и стабилизации капсида участвуют несколько белков ЦМВ, включая UL77, UL93, UL51 и UL52.

Локализация капсида, упаковка и нарезка вирусной ДНК регулируются с помощью фосфорилирования. В поддержании репликации ДНК ЦМВ участвуют UL97-киназа и регуляторные киназы клеточного цикла. После формирования в ядре нуклеокапсиды транслоцируются в цитоплазму. Белок гена *UL32* pp150 – основной тегументный белок ЦМВ, добавляется к нуклеокапсиду в ядре и сопутствует созреванию частиц в цитоплазме. Транслокация нуклеокапсида из

ядра в цитоплазму осуществляется с помощью консервативного для герпесвирусов «ядерного выводящего комплекса» (NEC), который расположен на внутренней поверхности ядерной мембраны. Особенностью этого процесса является то, что предпочтение получают ДНК-содержащие капсиды, а не дефектные частицы.

После формирования вирионы транслоцируются к поверхности клетки в небольших везикулах. В результате созревания вириона ядро клетки приобретает характерную форму – «почка», в то время как клетка приобретает характерный внешний вид – «глаз совы». После того, как вирионы окружены оболочкой, они переносятся в везикулы и выходят из клетки путем экзоцитоза во внеклеточное пространство.

1.1.3 ЛАТЕНТНАЯ ИНФЕКЦИЯ И РЕАКТИВАЦИЯ ЦМВ

Для ЦМВ характерна медленная репликация и строгий видовой тропизм, но широкий тропизм для типов клеток внутри хозяина. ЦМВ является самым большим из герпесвирусов человека, сложность генома которого обеспечивает богатую молекулярную платформу, которая управляет множеством разнообразных процессов в клетке-хозяине, способных модулировать латентные, персистирующие и литические формы инфекций.

После проникновения ЦМВ в организм не наблюдается полной элиминаций вируса. Во время латентной инфекции ЦМВ экспрессирует ряд латентных вирусных генов при отсутствии полностью продуктивной вирусной репликации [254]. Считается, что недифференцированные гемопоэтические клетки-предшественники в костном мозге и моноциты являются основным резервуаром латентной инфекции ЦМВ [115]. При получении внешнего стимула может происходить дифференцировка этих клеток и реактивация литической репликации [236]. При реактивации ЦМВ способен поразить различные ткани, вызывая пневмонию, колит, гепатит и другие заболевания [157]. При снижении иммунитета, вызванном иммуносупрессивным лечением у пациентов с

трансплантацией, больных раком, врожденными иммунодефицитами, ВИЧ в стадии СПИДа, и/или при старении, реактивация может привести к виремии ЦМВ, опасному для жизни заболеванию, и даже смерти [108, 156, 168, 176].

Исследования латентно инфицированных моноцитов, выделенных из организма (*ex vivo*), показали, что под действием ряда факторов происходит дифференцировка моноцитов в макрофаги с последующей реактивацией ЦМВ. Эти данные подтверждают роль моноцитов в распространении ЦМВ [268]. Важность моноклеарных клеток миелоидной дифференцировки в распространении вируса была подтверждена исследованиями *in vivo*. В результате заражения мышей мышинным ЦМВ (мЦМВ) оказалось, что моноциты являются преобладающим типом клеток, ответственных за диссеминацию вируса в организме при литической ЦМВИ [87].

Латентность ЦМВ, вероятно, достигается благодаря вирусным факторам, супрессирующим репликацию [115] в непермиссивной клеточной среде, что способствует эпигенетическому молчанию вирусного генома [241, 242] и ингибированию экспрессии «литических» вирусных генов [213].

В настоящее время описаны следующие вирусные гены, которые экспрессируются в латентном состоянии ЦМВ, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Латентные гены цитомегаловируса.

Латентные гены, кодируемые геномом ЦМВ	ссылки
<i>UL133-UL138</i>	[119],[276]
<i>UL144</i>	[224]
<i>US28</i> вирусный G-связанный рецептор	[43],[284]
латентный уникальный ядерный антиген (LUNA)	[152],[231]
латентно-ассоциированный вирусный гомолог IL-10 (LAcmvIL-10), кодируемый <i>UL111A</i>	[142],[225]

ассоциированный с латентностью транскрипт, с дистального промотора MIE	[290]
длинные некодирующие РНК длиной 2,7 кб и 4,9 кб	[238]
<i>UL82</i>	[287]

Особое место занимает ген *UL123*, кодирующий белок IE1-p72, экспрессия которого наблюдалась как при латентной, так и при литической инфекции [273].

ЦМВ координирует экспрессию двух вирусных генов, *UL135* и *UL138*, которые играют противоположные роли в регуляции репликации вируса [277]. *UL135* способствует реактивации из латенции и репликации вируса, частично, путем преодоления подавляющих репликацию эффектов *UL138*. *UL136* может представлять собой локус в пределах локуса *UL133-8*, который функционирует для изменения баланса инфекции между репликативным (*UL135*- доминантным) и латентным (*UL138*-доминантным) состояниями (рисунок 2).

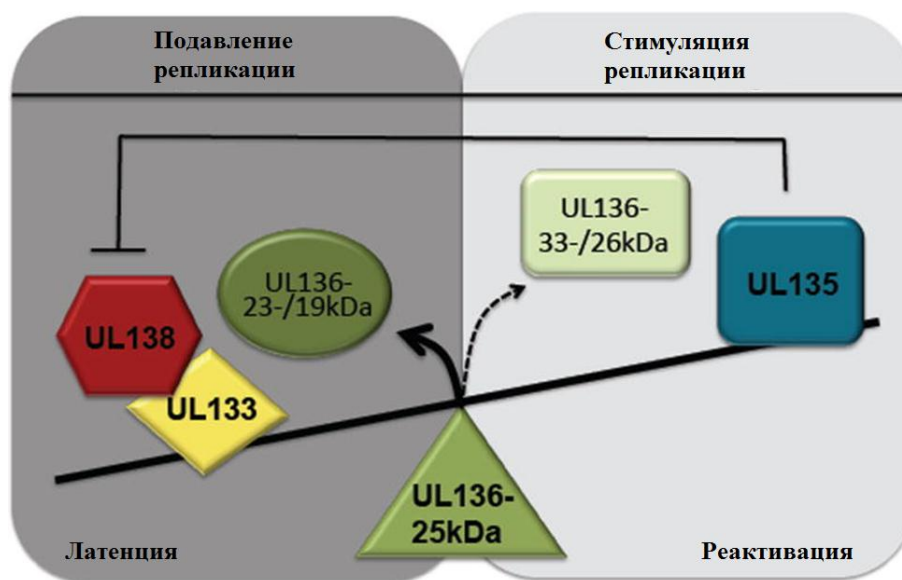


Рисунок 2. Модель синергетических и антагонистических взаимодействий между белками UL133 - UL138 в регуляции латентности. Рисунок адаптирован из статьи F. Goodrum [114].

Антагонистическая или синергетическая роль белков представляет собой важный аспект посттрансляционного контроля. Белки UL135 и UL138 нацелены

на одну и ту же рецепторную тирозинкиназу (RTK), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [58]. EGFR является основным гомеостатическим регулятором, вовлеченным в клеточную пролиферацию, дифференцировку и выживание, что делает его идеальной мишенью для вирусных манипуляций во время инфекции. Вход в латенцию или выход из нее представляют собой важную, но не до конца решенную проблему. Показано, что мажорные IE белки являются основными факторами перехода латенции в реактивацию. Экспрессия главного сверххранного промотера MIEP является ключом перехода вирусной латенции в реактивацию. В вирусном геноме MIEP эпигенетически неактивен и требует активации вирусными белками тегумента pp71 и ppUL69, а также IE белками, которые в течение инфекции остаются активными.

В последнее время стало очевидно, что латентность не означает полного транскрипционного покоя вирусного генома во всех его генетических локусах [114, 118]. Латентность может быть гораздо более динамичной, чем принято считать. Таким образом, текущая линейная модель экспрессии вирусных белков «сверххранный (IE) → ранний (E) → поздний (L)» больше не должна быть единственной доминирующей моделью для учета биологии латентных и литических форм инфекции и реактивации. Инфицированные клетки могут экспрессировать IE гены, что не обязательно приводит к литической инфекции, с другой стороны, активность IE генов может наблюдаться в латентных клетках [164]. Ряд новых фактов были получены при изучении прогениторных клеток CD34+ и опухолевых клеток миелоидного происхождения. Показано, что латентно инфицированные клетки могут экспрессировать IE гены, но не способны продуцировать вирусное потомство при стимуляции *ex vivo*. Кроме того, эктопическая экспрессия белков IE1-p72 и IE2-p86 недостаточна для продукции инфекционного потомства в зараженных миелоидных опухолевых клетках THP-1 [299]. Известно, что в латентно инфицированных миелоидных клетках могут экспрессироваться и некоторые другие вирусные гены [93, 254].

До недавнего времени считалось, что сохранение ЦМВ у здоровых людей не имеет последствий для здоровья. Длительная персистенция ЦМВ (в течение

всей жизни) не приводит к истощению Т-клеток [208], возможно, потому, что персистенция ЦМВ имеет периоды латентности. Тем не менее присутствие маркеров ЦМВ (ДНК, белки) вызывают реакции CD4⁺ и CD8⁺ клеток. Кроме того, у латентно/персистентно инфицированных лиц обнаружены повышенные уровни ИЛ-6 и неоптерина в сыворотках крови, что указывает на хроническое воспаление и иммунную активацию, соответственно. В настоящее время показано, что ЦМВИ связана с повышенным риском сосудистых заболеваний, включая атеросклероз [56] и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний, особенно у пожилых женщин [255]. ДНК ЦМВ в моноцитах присутствует у 55-60% ЦМВ-серопозитивных лиц старшего возраста. ЦМВ-специфические Т-клетки в периферическом кровообращении инфицированных лиц [269] составляют около 10% и с возрастом их количество увеличивается до 30% [124]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что ЦМВИ представляет риск для здоровья, поскольку иммунный ответ не стерильный, вакцины нет, а имеющиеся противовирусные препараты нацелены только на активно реплицирующийся вирус и не могут использоваться в течение длительного времени из-за токсичности и развития резистентности. Разработка стратегий, нацеленных на латентный вирус при отсутствии заболевания, имеет решающее значение для контроля или ликвидации ЦМВИ – цели, которая требует фундаментального понимания молекулярных основ латентности.

1.1.4. ИНГИБИТОРЫ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ

Основные утвержденные противовирусные препараты прямого действия, применяемые в терапии ЦМВИ (рисунок 3), включают следующие функциональные группы: 1) органический аналог пиррофосфата (фоскарнет); 2) ациклические аналоги гуанозина (ацикловир, валацикловир, фамцикловир, валганцикловир, пенцикловир, ганцикловир); 3) ациклические фосфонатные аналоги нуклеозидов (цидофовир, тенофовир, адефовир) [89].

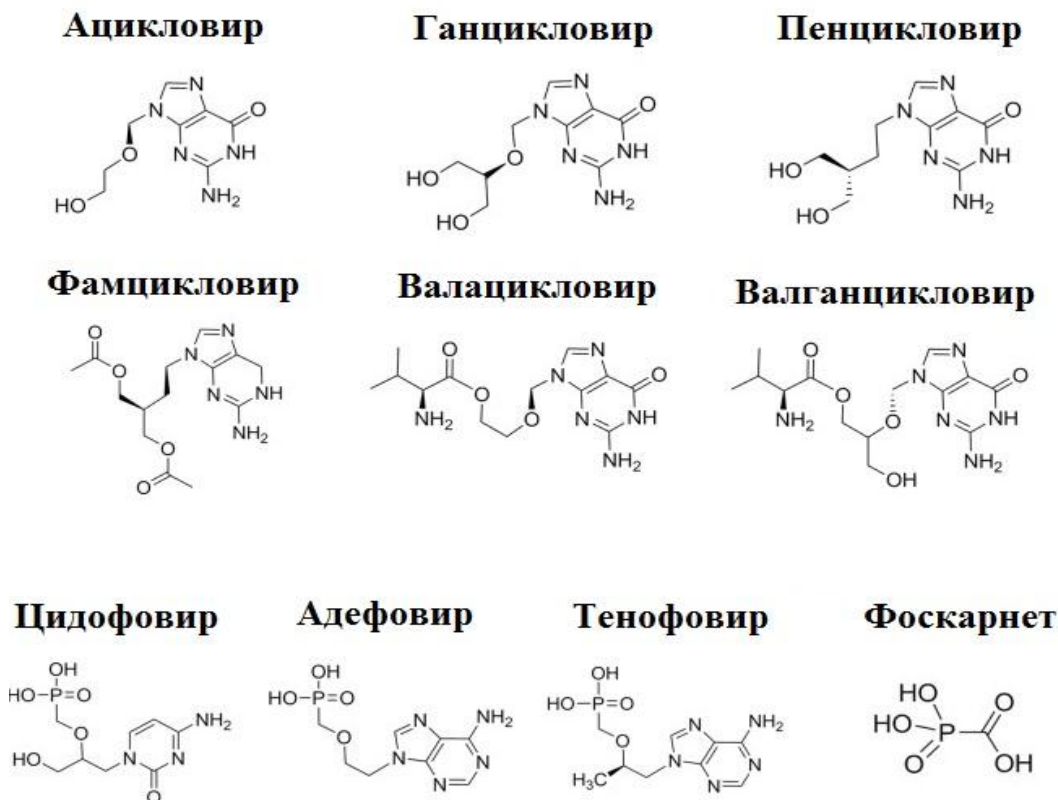


Рисунок 3. Химические формулы противовирусных препаратов, применяемых в терапии ЦМВИ. Рисунок адаптирован из статьи Erik De Clercq and Guangdi Li, 2016 [89].

В дополнение к одобренным противовирусным препаратам в отношении ЦМВ на 3-ей фазе клинических испытаний находится летермовир [96]. Летермовир (МК-8228 или аіс246) является производным 3,4-дигидрохиназолин-4-ил-уксусной кислоты, нацелено на субъединицу pUL56 комплекса терминазы ЦМВ, которая блокирует обработку и/или упаковку вирусной ДНК [293]. В экспериментах *in vitro*, летермовир показал противовирусную активность при меньших концентрациях (EC_{50} от 0,0035 до 0,0056 мкм) в сравнении с ганцикловиром (EC_{50} от 0,32 до 2,39 мкм) [171].

Азотсодержащие гетероциклические соединения являются одними из наиболее распространенных структурных составляющих, примерно в 80% продаваемых лекарственных средств. В то же время известно, что эти препараты имеют недостатки, которые ограничивают их применение для лечения некоторых групп больных [291]. В связи с этим наше внимание привлекли аналоги бензимидазолов, которые проявляют широкий спектр терапевтической

активности, оказывая противоопухолевое, антибактериальное, противопаразитарное, противовирусное, а также противогрибковое действие [282]. Бензимидазол - это гетероцикл, содержащий бензол и имидазол, на основе которого за последние несколько лет получены ряд производных. На перспективность исследований этой группы низкомолекулярных соединений указывает выдача патентов на ряд соединений [28].

Создание низкомолекулярных соединений, которые образуют комплексы с АТ-парами нуклеотидов в дцДНК, подобных бензимидазолам, могут быть использованы в качестве ингибиторов ДНК-зависимых ферментов для изучения регуляции транскрипции генов. Наиболее перспективными в этом плане являются низкомолекулярные соединения, взаимодействующие нековалентно с азотистыми основаниями дцДНК по узкой бороздке. «Узкобороздочные лиганды» свободны от недостатков, присущих традиционным биологически активным препаратам на основе алкилирующих агентов и интеркаляторов. Они не повреждают ДНК, не вызывают значительного искажения ее пространственной структуры и свободны от побочного мутагенного эффекта [39].

С помощью компьютерного моделирования предложена структура новой серий симметричных флуоресцентных димерных бисбензимидазолов DBA(n), способных при комплексообразовании с АТ-богатым дуплексом занимать в его узкой бороздке примерно около одного витка ДНК (рисунок 4).

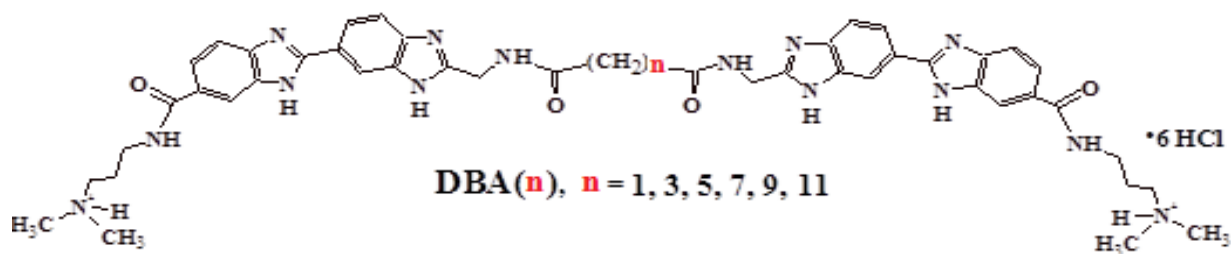


Рисунок 4. Химическая формула димерных бисбензимидазолов DBA(n). Рисунок адаптирован из статьи Климовой Р.Р. и соавт. [11].

В молекулах DBA(n) бисбензимидазольные фрагменты соединены («tail-to-tail» олигометиленовыми линкерами различной длины ($n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$), обеспечивающими им структуру изогеометричную узкой бороздке ДНК. Благодаря этому данные соединения могли действовать как бидентатные лиганды, способные узнавать нуклеотидные последовательности, содержащие блоки из двух АТ-пар, находящихся на разных расстояниях друг от друга.

Данные, полученные при анализе противовирусной активности, показали, что соединения DBA(1) и DBA(7) обладают терапевтическими свойствами в отношении ВПГ-инфекции *in vitro*, причем DBA(7) полностью подавляет вирусную инфекцию. Соединение DBA(11) проявило лечебные свойства как в отношении ВПГ-инфекции, так и ЦМВ-инфекции *in vitro*.

Кроме того, DBA(7) и DBA(1) проявили микробицидную активность. Таким образом, соединение DBA(11), проявляющее активность против двух широко распространенных вирусных инфекций, заслуживает дальнейших исследований [11].

1.2. ЦМВ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Несмотря на десятилетия генетических исследований человека, и поисков канцерогенов окружающей среды, только небольшой процент основных злокачественных опухолей человека явно приписывается известным врожденным генетическим мутациям или канцерогенам окружающей среды. В то же время все возрастающий процент злокачественных новообразований человека в последние несколько десятилетий приписываются инфекционным агентам [127].

Большинство известных онкогенных вирусов человека используют ДНК в качестве своего геномного материала. Исследования, проведенные за последние четверть века, показали, что ряд вирусов характеризуются прямым вмешательством в онкогенез. При этом вирусная нагрузка может быть низкой, даже когда вирусы являются основными причинами рака [103].

ЦМВ не считается признанным онкогенным вирусом, несмотря на данные *in vitro*, которые предполагают, что он может вызывать трансформацию фибробластов в культуре [90].

В настоящее время нет убедительных доказательств того, что ЦМВ проявляет онкогенные свойства, поскольку нормальные клетки не трансформируются после инфекции. Вместе с тем многочисленные исследования поддерживают теорию, что ЦМВ может онкомодулировать неопластический процесс [144]. Поэтому помимо хорошо описанного воздействия ЦМВИ на иммуносупрессированных пациентов в последнее время изучается роль цитомегаловируса человека в патогенезе рака [127]. Исследования показали, что в некоторых видах опухолей у большинства пациентов (до 90-100%) выявляются ДНК и белки цитомегаловируса (ЦМВ) человека. Данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Выявление ДНК и белков ЦМВ в разных видах опухолей человека.

Опухоль	ДНК ЦМВ, методы определения	ссылки	Белки, методы выявления в срезах	ссылки
Мультиформная глиобластома	Гибридизация <i>in situ</i> , ПЦР, сиквенирование ОТ-ПЦР	[86] [228] [230] [271]	Иммуногистохимия Иммунофлюоресцен- ция	[228] [230] [271]
Злокачественная глиома	ОТ-ПЦР, сиквенирование	[47] [76]	Иммуноблот	[47] [76]
Медуллобластома	Гибридизация <i>in situ</i> , ПЦР, сиквенирование	[40]	Иммуногистохимия, иммунофлюоресцен- ция	[40]

Нейробластома	ПЦР	[295]	Иммуногистохимия	[295]
Олигодендроглиома	ПЦР	[86]	Иммунофлюоресценция	[86]
Менингиома	ПЦР	[86]	Иммунофлюоресценция	[86]
Колоректальный рак	Гибридизация in situ, ПЦР, сиквенирование	[36] [72] [126]	Иммуногистохимия	[126]
Карцинома предстательной железы	Гибридизация in situ, ПЦР, сиквенирование	[243]	Иммуногистохимия	[243]
Карцинома молочной железы	Гибридизация in situ, ПЦР, сиквенирование	[125] [272]	Иммуногистохимия	[125] [272]
Рак вульвы	ПЦР	[15]		
Рак челюстно-лицевой области	ПЦР	[6] [19]		
Рак мочевого пузыря	ИФА ПЦР	[13]		
Гепатоцеллюлярная карцинома	ПЦР	[165]		

Рак желудка	ПЦР ОТ-ПЦР	[90] [163] [304]		
-------------	---------------	------------------------	--	--

Стоит отметить, что ДНК и антигены ЦМВ были обнаружены в глиобластомах, олигодендроглиомах и менингиомах у пациентов при отсутствии антител к ЦМВ в крови. ПЦР не выявил также ДНК ЦМВ в периферической крови у пациентов с ЦМВ-положительными интракраниальными опухолями [48].

В ряде исследований не удалось подтвердить связь ЦМВ с плоскоклеточным раком полости рта [246], эпителиальным раком яичников [135] и неходжскинской лимфомой [278]. Авторы не обнаружили нуклеиновые кислоты ЦМВ или вирусные белки ни в одном из этих образцов. Однако важно отметить, что в вышеупомянутых исследованиях не применялся высокочувствительный иммуногистохимический подход, который позволяет обнаружить прямые маркеры ЦМВ при низком их содержании в образцах человека. Врожденная ЦМВИ недавно была идентифицирована как фактор риска острого лимфолейкоза у детей [292], а антитела к ЦМВ были обнаружены у первичных больных ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой [26]. Серопозитивность на ЦМВ донора и/или реципиента приводит к снижению общей выживаемости у пациентов с хроническими гематологическими злокачественными новообразованиями, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток [250].

Учитывая противоречивый характер выявления ЦМВ в опухолях разного происхождения, в настоящей работе был проведен количественный анализ ДНК ЦМВ и вирусных белков в динамике ЦМВИ клеток моноцитарной лейкемии ТНР-1. Получение таких данных важно для оценки последствий вирусного инфицирования опухолей гематологического происхождения, для усовершенствования методов лечения и разработки профилактических стратегий.

1.3. АНТИБИОТИК ДОКСОРУБИЦИН В ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТАМ

Доксорубицин (ДОКС) считается одним из наиболее эффективных химиотерапевтических средств, используемых в качестве лекарственного препарата первого ряда при многочисленных типах рака [298]. В то же время известно, что этот антибиотик имеет серьезные побочные эффекты, которые объясняются, прежде всего, действием на нормальные активно пролиферирующие клетки (волосные луковицы, эпителий желудочно-кишечного тракта, костный мозг, гонады). Побочный эффект ДОКС обнаруживается и в менее активно делящихся клетках, таких как кардиомиоциты, что приводит к высокой кардиотоксичности [219, 298], приводящей к сердечной дисфункции [130], интерстициальному фиброзу миокарда и появлению вакуолизированных кардиомиоцитов [167], вызывает кардиомиопатию у детей [64, 160, 235]. Поэтому при лечении рака крайне важно минимизировать токсичность при сохранении эффективности. Исследования в этом направлении проводятся в ряде лабораторий, и некоторые осложнения удается минимизировать [86, 167].

ДОКС, химическая формула $C_{27}H_{29}NO_{11}$, относится к семейству антибиотиков антрациклинового ряда, вместе с даунорубицином, эпирубицином и дарубицином. Изучены физико-химические свойства ДОКС [60], определена структурная формула (рисунок 5).

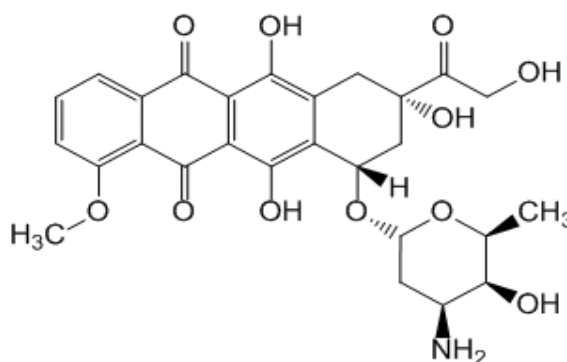


Рисунок 5. Структурная формула доксорубицина. Рисунок адаптирован из статьи М. Cagel и соавт. [60].

В настоящее время ДОКС показан Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) для следующих неопластических состояний: острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, опухоль Вильмса, нейробластома, саркомы мягких тканей и костей, рак молочной железы, рак яичников, рак переходных клеток мочевого пузыря, рак щитовидной железы, желудочный рак, болезнь Ходжкина, злокачественные лимфомы и бронхогенная карцинома [270].

Имеются данные о механизмах действия ДОКС:

- интеркалирование между парами оснований цепей ДНК, подавление синтеза ДНК и РНК в быстро растущих клетках; блокирование процессов репликации и транскрипции;
- образование активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид, гидроксильные радикалы или пероксид. АФК могут вызывать окислительный стресс, перекисное окисление липидов, повреждение мембран и ДНК и запускать апоптоз [2];
- ингибирование фермента топоизомеразы II и как следствие – предотвращение репликации, транскрипции ДНК и ее репарации [60] [116].
- нарушение внутриклеточной регуляции кальция; активация кальций-зависимых протеаз [148].
- ремоделирование внеклеточного матрикса путем ингибирования коллагеназы/матриксной металлопротеиназы 1 (ММР-1) [214]

Несмотря на имеющиеся данные, все молекулярные пути действия ДОКС до конца не изучены. Это может быть связано с большим разнообразием типов опухолей, на которые действует ДОКС. Тем не менее, использование антрациклинов в течение более 40 лет улучшило статистику выживаемости при раке [298]. Основная причина неэффективности лечения – устойчивость к химиотерапии, что усугубляет проблемы, связанные с токсичностью. Это особенно актуально для пациентов с прогрессирующим заболеванием, требующим повышения дозы. Использование ДОКС вызывает дегенеративно-

дистрофические изменения в печени, массивную гибель гепатоцитов [10] и оказывает кардиотоксический эффект [12]. Наряду с токсичностью важной остается проблема устойчивости к ДОКС, причем обычно инвазивные раковые клетки проявляют более высокую устойчивость к противоопухолевым препаратам, чем неинвазивные раковые клетки [50].

Для объяснения резистентности к ДОКС предложены разные механизмы, такие как сниженное включение и увеличенный экспорт из раковых клеток, эффективная репарация ДНК, количественные и качественные изменения ферментативной активности топоизомеразы II [97].

В то же время проблема преодоления резистентности к антибиотику остается важной и актуальной. Можно заключить, что изучение механизмов, лежащих в основе резистентности опухолевых клеток к химиотерапии, и поиск новых терапевтических мишеней являются одними из ключевых подходов для преодоления лекарственной устойчивости, улучшения терапевтического результата лечения рака и минимизации потенциальных фармакокинетических воздействий лекарственных препаратов.

1.4. УЧАСТИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МОЛЕКУЛЯНЫХ ПУТЕЙ В АПОПТОЗЕ И ВЫЖИВАНИИ КЛЕТОК ПРИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

1.4.1. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ E2F1 И P73

1.4.1.1. Семейство транскрипционных факторов E2F1

Семейство транскрипционных факторов (ТФ) E2F играет важную роль в жизненном цикле клеток, а также в онкогенезе. Белки E2F влияют на экспрессию генов, необходимых для дифференцировки, пролиферации, апоптоза, репарации и репликации ДНК [302]. От первого упоминания в работах с 1986 г., где факторы транскрипции E2F были впервые идентифицированы как белки, способные

связываться с промотором гена аденовируса E2 [35, 159] до сегодняшнего дня было открыто десять членов семейства E2F: E2F1-E2F8 (рисунок 6) [102].

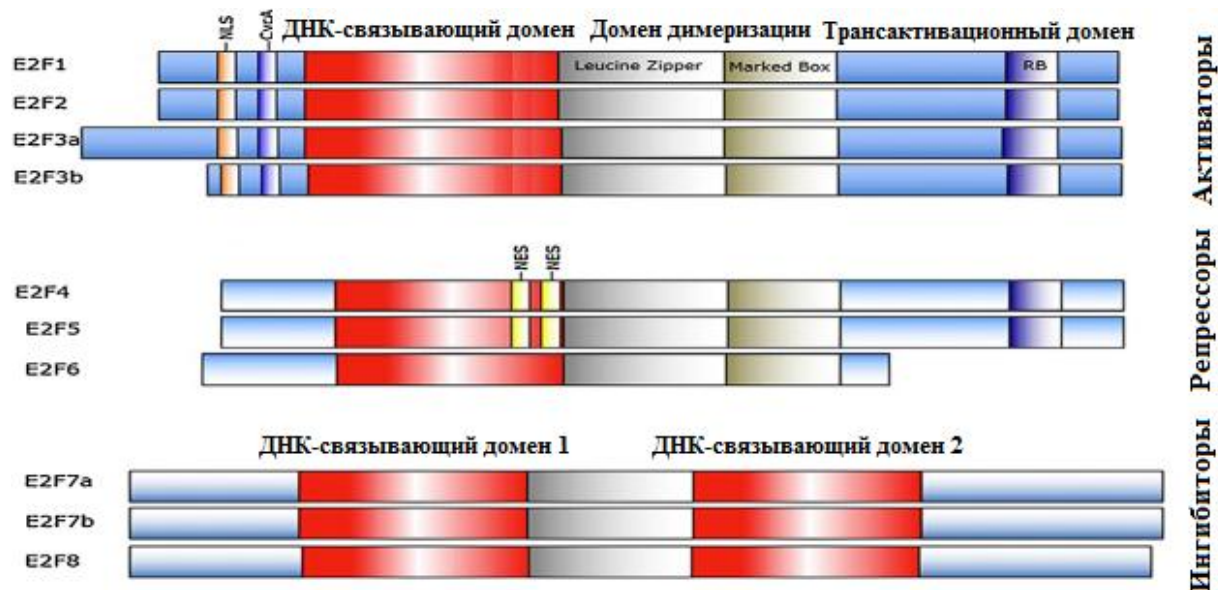


Рисунок 6. Члены семейства E2F и их доменные структуры. Рисунок адаптирован из статьи M.G. Ertosun и соавт. [102].

Семейство E2F условно делится на три группы, исходя из функции в регуляции транскрипции [303]. E2F1, E2F2 и E2F3a (E2Fs-активаторы) обычно являются активаторами транскрипции посредством связывания с промоторами генов-мишеней, которые критичны для прохождения поздней фазы G1 клеточного цикла, синтеза нуклеотидов и репликации ДНК в S-фазе. E2F3b, E2F4 и E2F5 (E2Fs-репрессоры) в настоящее время известны как транскрипционные репрессоры, они функционируют в стадии пролиферативного покоя (фаза G0) или ранней фазы G1. E2F6 и недавно обнаруженные E2F7 и E2F8 образуют отдельную группу, которая функционирует в фазе G2. Эти факторы имеют сходные функции с E2Fs-репрессорами и их также называют E2Fs-ингибиторами [102].

Следует отметить, что E2F1-E2F6 требует гетеродимеризации с одним из трех белков-партнеров-димеров (DP1, DP2 и DP3), в результате образуется функциональный ДНК-связывающий домен (DBD), который может

взаимодействовать с промоторами целевого гена. Напротив, E2F7 и E2F8 связываются с ДНК независимо от белка DP [52]. E2F1-E2F5 регулируют активность транскрипции посредством взаимодействия с семейством карманных белков (pocket proteins) pRb, p107 и p130, которые названы за существование бороздки между их консервативными доменами А и В [302]. Как правило, связывание E2Fs с семейством карманных белков заканчивается ингибированием активности E2F. Однако семейство карманных белков может быть гиперфосфорилировано циклин-зависимыми киназами (CDKs), что приводит к активации транскрипционного действия E2F [226].

E2F1 состоит из 437 аминокислот, молекулярная масса 47 кДа, максимальный уровень экспрессии наблюдается в фазе G1/S клеточного цикла, во время которого он индуцирует транскрипцию генов, необходимых для синтеза ДНК [73]. Именно по этой причине E2F1 рассматривается как один из наиболее важных белков, необходимых для вступления в S-фазу и прогрессии клеточного цикла. Функция белка E2F1 регулируется белком ретинобластомы (pRb). Когда pRb не находится в своей гиперфосфорилированной форме, он связывается с E2F1 через его карманный домен и ингибирует специфичное связывание ДНК. При фосфорилировании pRb E2F1 высвобождается из ингибиторного комплекса Rb/E2F1 и связывается с его партнерами по димеризации: DP1 или DP2.

E2F1 играет значительную роль в апоптозе. Способность E2F1 индуцировать апоптоз в значительной степени зависит от индукции транскрипции p53, p14ARF и подавления экспрессии MDM2. Более того, E2F1 может запускать апоптоз независимо от p53, индуцируя экспрессию Araf-1 и p73 и подавляя экспрессию Mcl-1. С другой стороны, E2F1 также может индуцировать экспрессию Bcl-2, которая ингибирует выход цитохрома С и индуцирующий апоптоз фактор (AIF), обеспечивая механизм подавления апоптоза [102]. Схема, приведенная на рисунке 7, демонстрирует возможность участия E2F1 в разнонаправленных процессах – пролиферация и апоптоз.

Вопрос о том, как один транскрипционный фактор может регулировать пролиферацию как положительно, так и отрицательно, в зависимости от

клеточных потребностей, остается пока без ответа. Вероятно, клеточный цикл может регулироваться как путем связывания E2F1 с различными белками-партнерами, так и путем посттрансляционных модификаций E2F1. Показано, что E2F1 модифицируется несколькими различными клеточными киназами, метилтрансферазами и ацетилтрансферазами [102]. Кроме того, гены E2F1-E2F8 содержат сайты связывания miRNA, что свидетельствует о регуляции экспрессии этих генов посредством miRNA [1].

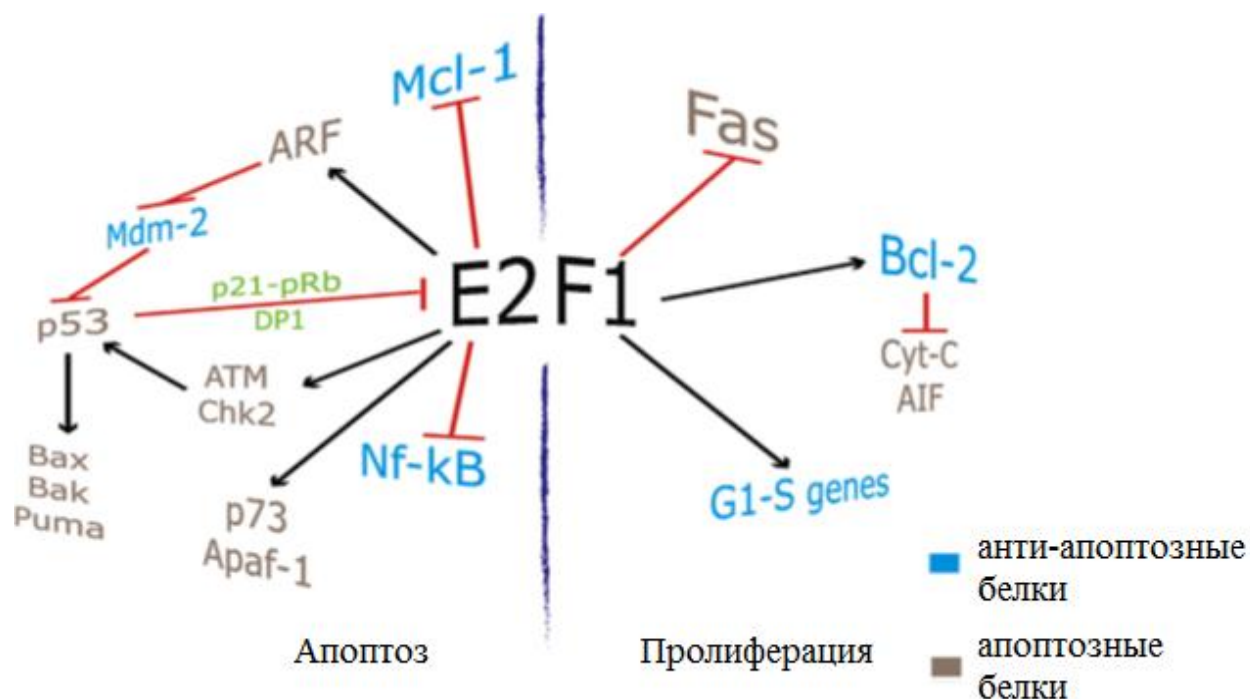


Рисунок 7. Гены, экспрессия которых регулируется E2F1 во время апоптоза и пролиферации. Рисунок адаптирован из статьи M.G. Ertosun и соавт. [102].

Исследования последних 15 лет показали сложную картину взаимодействий с участием E2F1 во множестве процессов. Помимо того, что он является одним из регуляторов клеточного цикла, E2F1 принимает участие в контроле метаболизма не только при нормальной физиологии, но также и при патологических состояниях, таких как ожирение и рак [91].

Появляется все больше свидетельств того, что путь Rb-E2F1 модифицирован в значительной части злокачественных опухолей человека. В начале заболевания E2F1 действует как супрессор опухолей и способствует

апоптозу в ответ на повреждение ДНК [101]. Потом он переключается, способствуя прогрессированию рака на поздних стадиях [29]. E2F1 может провоцировать метастазирование, вызывать хеморезистентность и способствовать развитию ангиогенеза [99, 154, 194, 289]. Высокие уровни E2F1 часто коррелируют с агрессивностью опухоли и неблагоприятным исходом у пациентов с некоторыми типами рака: меланома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак предстательной железы и мелкоклеточный рак легкого [37, 104, 162, 253, 285].

Ряд белков ЦМВ непосредственно инактивирует белки семейства Rb, по-видимому, для создания среды, более благоприятной для репликации вируса [132]. Белок Rb становится гиперфосфорилированным уже через 4 часа после заражения ЦМВ покоящихся (G0) клеток [141]. ЦМВ протеинкиназа UL97 необходима и достаточна для фосфорилирования и инактивации белка Rb [131] (рисунок 8).

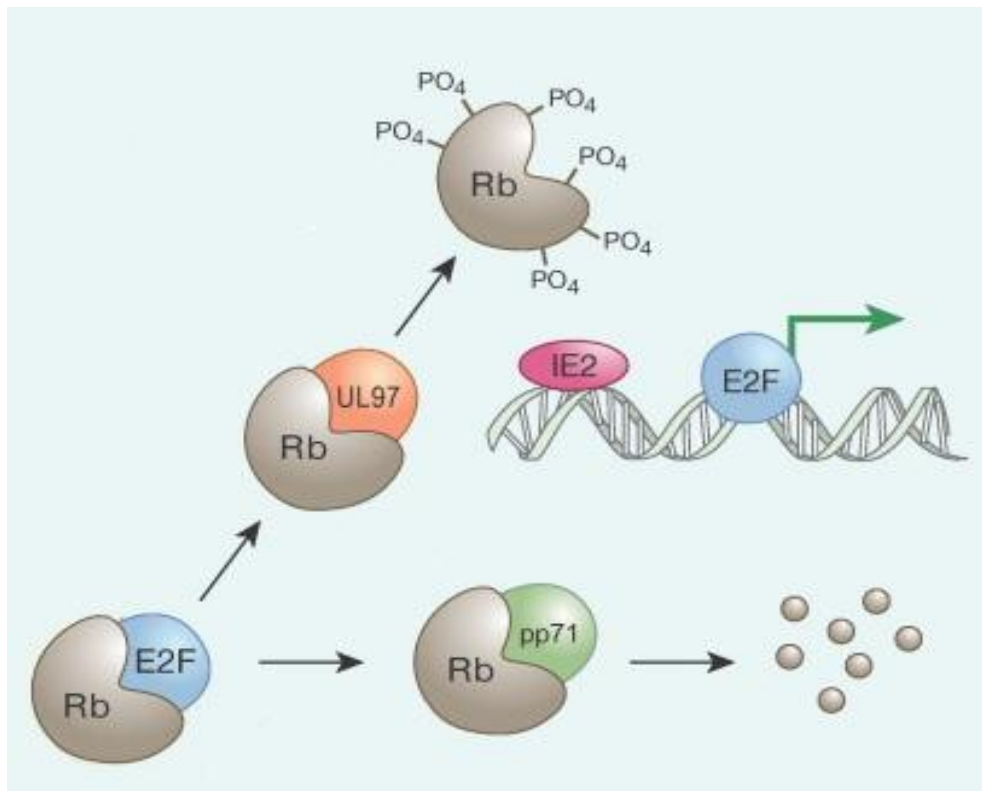


Рисунок 8. Механизмы, используемые ЦМВ для модуляции пути Rb-E2F. Рисунок адаптирован из статьи A.J. Hume и R.F. Kalejta [132].

Молекулярные механизмы, которые использует pUL97 для инактивации Rb, отличаются от тех, которые используют классические вирусные онкопротеины. Это может быть одной из причин, по которой ЦМВ не является классическим опухолевым вирусом, хотя, бесспорно, по мнению ряда исследователей, имеет сложную взаимосвязь с раком человека [94, 128, 230, 263]. Понимание различий между инактивацией белка Rb вирусными онкопротеинами и ЦМВ pUL97 может выявить ключевые функции пути Rb-E2F1, которые защищают клетки от трансформации, возможно, приводя к лучше переносимой химиотерапии рака [137].

Лекарственная устойчивость является основной причиной смерти от рака. Традиционное лечение генотоксическими препаратами способствует отбору хеморезистентных клеток в генетически гетерогенных опухолях, что требует нарушения регуляции с участием E2F1 и других факторов транскрипции, таких как p73. Известно, что E2F1 стимулирует экспрессию супрессора опухоли p73 и его усеченной на N-конце изоформы (называемой DNp73) посредством прямой трансактивации гена *TP73*, в то время как полноразмерный белок p73 ингибирует развитие рака, вызывая остановку клеточного цикла и апоптоз [281].

Расшифровка молекулярных путей, в которых участвует транскрипционный фактор E2F1, в том числе при формировании резистентности опухолей, поможет лучше понять его сложную биологию, особенно в контексте рака и ЦМВИ.

1.4.1.2. Семейство транскрипционных факторов p53 и белок p73

Семейство p53 состоит из факторов транскрипции p53, p63 и p73. Онкосупрессивная функция p53 в значительной степени зависит от его способности воспринимать потенциальные онкогенные и генотоксические условия стресса и координировать сложный набор молекулярных событий, ведущих к торможению роста и, в конечном счете, к старению и гибели клеток. Таким образом, p53 является центральным узлом в молекулярной сети,

контролирующим пролиферацию и гибель клеток в ответ на патологические и физиологические состояния, в которые также вовлечены p73 и p63 [223]. Тот факт, что эта функция является общей для всех членов семейства, указывает на то, что это может быть эволюционно самая древняя функция [166]. Последние данные показывают роль семейства p53 в других биологических процессах, таких как самообновление стволовых клеток, клеточный метаболизм, фертильность или воспаление [110, 203, 206]. Таким образом, складывающаяся картина представляет собой взаимосвязанный путь, в котором p63 и p73 имеют много функциональных свойств с p53, но они также претендуют на различные и уникальные биологические роли [279].

Со структурной точки зрения, члены семейства имеют 65% сходство последовательности в ДНК-связывающем домене (DBD – DNA-binding domain) [136], который является основой для значительного перекрытия целевых генов и гиперфункционирования белков семейства p53 [206]. Однако наличие стерильного альфа-мотива (SAM – sterile alfa motif) у белков p73 и p63 увеличивает структурную сложность этих элементов и может учитывать уникальную сигнальную сеть регуляторов и транскрипционных мишеней [74]. Домен SAM p73 отвечает за взаимодействия, участвующие в регуляции транскрипционной способности p73, а также предполагается его потенциальный вклад в олигомеризацию транскрипционного фактора. p73 α является единственной изоформой, которая содержит полностью функциональный домен SAM [283]. Сложность биологических функций в этом семействе связана с образованием олигомеров. Тетрамерное состояние характерно для всех членов семейства p53. p73 может образовывать гетеро-взаимодействия с p63 и в меньшей степени – агрегат с формами мутантного p53 [206].

Все члены семейства экспрессируются в виде N-концевых форм, содержащих трансактивационный домен (TA) или усеченных (DN) изоформ и множественных 3'-альтернативных сплайсинговых C-терминальных изоформ, которые могут содержать или исключать домен SAM [3]. p73 в 3' регионе является более сложным, так как он может пройти большее количество

альтернативного сплайсинга, производя не менее семи изоформ (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η), в то время как p53 и p63 могут производить только 2 или 3 изоформы (α , β , γ) [74].

Более того, *TP73* генерирует функционально разные изоформы TAp73 и DNp73 [61]. В зависимости от присутствия N-терминального транскрипционно активного ТА-домена, варианты TAp73 демонстрируют онкосупрессорные функции. И наоборот, N-концевые усеченные DN-изоформы выступают в качестве доминантно-отрицательного ингибитора TAp73 и, таким образом, обладают онкогенными свойствами [100]. Примечательно, что члены семейства p53 не только индуцируют несколько общих целевых генов, но также могут регулировать экспрессию и функцию друг друга [187].

Ген *TP73* (Tumor Protein p73) состоит из 15 экзонов и расположен на коротком плече хромосомы 1 (1p36.33) [139]. Ген *TP73* дает начало различным мРНК, которые кодируют несколько различных протеинов. Различные мРНК возникают путем использования двух альтернативных промоторов: P1 в 5'UTR 1 экзона и P2, расположенный между 3 и 4 экзонами, и альтернативного сплайсинга N- и С-конца (рисунок 9).

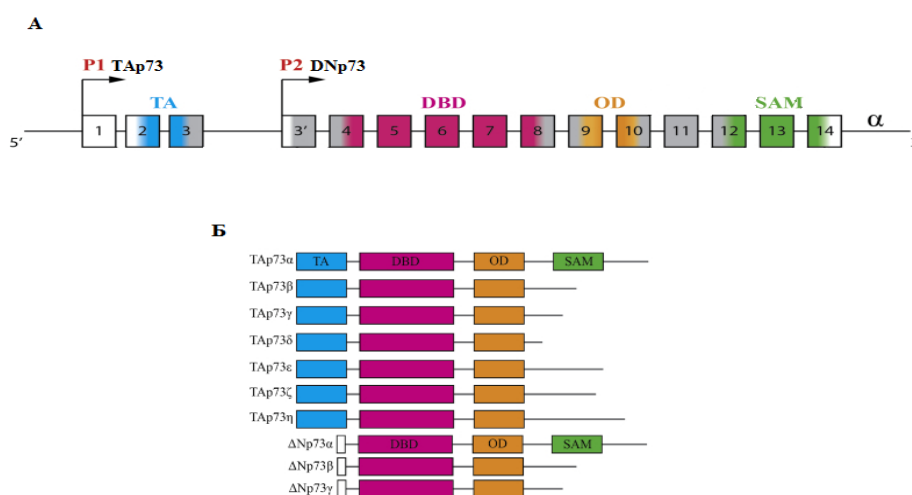


Рисунок 9. Схематическое изображение структуры гена *TP73*. (А) ген *TP73* состоит из 15 экзонов (белый, нетранслируемый регион). P1 и P2 – промоторы. (Б) изоформы белка p73. ТА - домен трансаактивации; DBD - ДНК-связывающий домен; OD - домен олигомеризации; SAM - домен стерильного альфа-мотива. Рисунок адаптирован из статьи P. Vikhрева et al. [283].

Транскрипция с двух разных промоторов гена *TP73* приводит к генерации TAp73 и DNp73 изоформ. Изоформа TAp73 содержит трансаktивационный домен (ТА), который кодируется 2 и 3 экзонами. Напротив, укороченная DNp73 изоформа не содержит трансаktивационного домена. Другая группа N-концевых усеченных изоформ p73 возникает при альтернативном сплайсинге N-концевой точки транскрипта, сгенерированного из промотора P1 (Δ Ex2p73, Δ Ex2 / 3p73 и Δ N'p73). В совокупности с гена *TP73* экспрессируется, по крайней мере, 29 различных транскриптов, но остается неопределенным, сколько из этих транскриптов действительно экспрессируются как белки [283].

Мутации в гене *p53* встречаются более чем в 50% опухолей человека [17, 18], тогда как *p73* редко мутирует [49, 177, 178]. Другой привлекательной характеристикой p73 является то, что он использует пути, которые полностью или частично перекрываются с путями p53, чтобы обеспечить тот же антионкогенный эффект [67]. С другой стороны, он использует p53-независимые пути для воспроизведения антионкогенных эффектов p53 [145]. Активируя пути, только частично перекрывающиеся с p53 (p73-зависимыми/p53-независимыми путями), p73 может обходить блоки, обусловленные нарушением эффекторов ниже p53 [178].

Функции изоформ p73 (TAp73 и DNp73), по-видимому, целесообразно исследовать одновременно, так как изучение по отдельности может обеспечить только ограниченное представление об их сложных функциях.

Изоформы p73 характеризуются как про-, так и антиапоптотическими свойствами [7, 82]. TAp73 и DNp73 сверхэкспрессируются в ряде солидных опухолей, включая рак легких, яичников, гепатоцеллюлярный рак, рак молочной железы и толстой кишки, и уровни их экспрессии связаны с прогнозом у пациентов с этими видами рака [308]. Недавние исследования показали, что латентные гены герпесвируса Капоши могут модулировать функцию p73 и способствуют выживанию латентно инфицированных клеток лимфомы [245]. Экспрессия p73 коррелирует с клеточной химиочувствительностью в клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) [173]. p73 может опосредовать

клеточный ответ на химиотерапевтические агенты, например, цисплатин, путем активации апоптотического сигнального пути JNK в раковых клетках яичников [305]. Опубликованы данные о том, что в регуляции транскрипции p73 участвует транскрипционный фактор E2F1 [150, 275].

В клетках нейронального происхождения (нейробластомы, астроцитомы) введение последовательностей p73 в составе аденовирусного вектора индуцировало апоптоз под действием цисплатина через рецепторы смерти (death receptors) [274]. Данные авторов показали, что на экспрессию p73 может влиять ЦМВ, подавляя экспрессию рецептора Fas и способствуя выживанию клеток при действии цисплатина. Изучение влияния ЦМВ на изменение содержания изоформ p73 в клетках гематологических опухолей, в том числе моноцитарной лейкемии ТНР-1 при действии противоопухолевого антибиотика ДОКС, может помочь найти новые перспективные мишени для преодоления хеморезистентности опухолей.

1.4.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПУТЬ PI3K/АКТ/MTOR И ЕГО РОЛЬ В КЛЕТОЧНОЙ ФИЗИОЛОГИИ

Сигнальный каскад PI3K/Akt/mTOR влияет на многие фундаментальные аспекты клеточной биологии, способствуя выживанию клеток, росту, пролиферации, миграции и энергетическому метаболизму [55, 296]. Серин-треониновая протеинкиназа mTOR (mammalian target of rapamycin) получила название, так как является мишенью ингибитора рапамицина. В клетках млекопитающих функционируют два сигнальных комплекса, включающих mTOR: комплекс mTOR 1 (mTORC1) и комплекс mTOR 2 (mTORC2) [143] (рисунок 10)

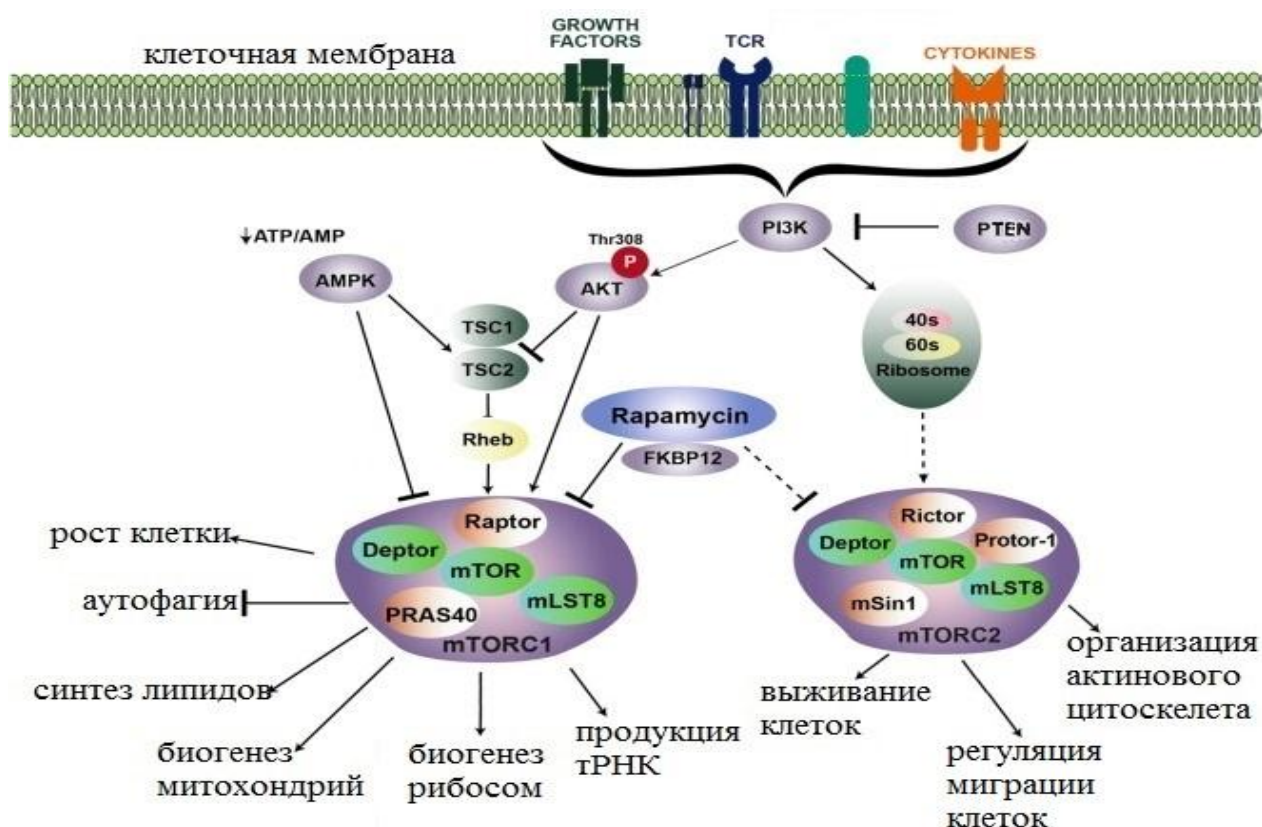


Рисунок 10. Сигнальные каскады, способствующие активации mTOR. mTOR регулирует множество клеточных процессов, функционируя как два гомодимерных комплекса: mTORC1 (Raptor - regulatory associated protein of mTOR; PRAS40 - proline-rich AKT substrate 40 kDa; Deptor - DEP domain TOR-binding protein; mLST8 - mammalian lethal with Sec-13 protein 8) и mTORC2 (Rictor – rapamycin insensitive companion of mTOR; mSin1 - mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein1; Protor-1 - protein-binding Rictor-1; Deptor; mLST8). Стрелки и столбцы представляют активацию и торможение соответственно. Пунктирные линии показывают, что точный механизм неизвестен. Рисунок адаптирован из статьи R. Keating1 и M. McGargill [151].

mTORC1 активируется в ответ на различные внеклеточные стимулы: питательные вещества, факторы роста, стресс, цитокины, стимуляция антигенами. Внеклеточные стимулы активируют mTORC1 путем запуска сигнального каскада через фосфотидилинозитол-3-киназу (PI3K) и серин-треониновую протеинкиназу (Akt) [185]. Отрицательная регуляция PI3K-опосредованной активации Akt осуществляется фосфоинозитидофосфатазой (PTEN) [185]. Akt затем

фосфорилирует фактор репрессии mTORC1, состоящий из комплекса туберозного склероза 1 и 2 (TSC1 и TSC2). Фосфорилирование комплекса TSC предотвращает его от блокирования Rheb (RAS homolog enriched in brain), которое необходимо для активации mTORC1. Активация mTORC1-зависимого сигнального пути стимулирует рост опухоли [9]. Напротив, активность mTORC1 подавляется, когда отсутствуют связанные с питательными веществами сигналы. Например, в ответ на снижение соотношения АТФ/АДФ активируется АМФ-киназа (АМРК), которая, в свою очередь, ингибирует активность mTOR путем фосфорилирования TSC2 или Raptor.

Активация mTORC2 не так хорошо изучена, как mTORC1. Подобно mTORC1, активация mTORC2 происходит по PI3K пути. Однако активация mTORC1 включает фосфорилирование в Akt треонина 308 (T308), в то время как mTORC2 действует при фосфорилировании серина 473 (S473). В отличие от активации mTORC1, активация mTORC2 происходит независимо от синтеза белка (рисунок 10) [151].

Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR физиологически регулируется с участием различных клеточных механизмов. При патологиях человека могут происходить нарушения регуляции. Так, описана активация пути mTOR при диабете, при сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях [256]. Изменения регуляции mTOR описано в различных солидных опухолях (глиома, рак легких, простаты [218], молочной железы [122], холангиокарцинома [75], гепатоцеллюлярная карцинома [123], колоректальный рак, рак яичников и эндометрия [169], рак щитовидной железы [22], а также гематологические злокачественные опухоли [84]).

Сигнальный каскад PI3K/Akt/mTOR чрезвычайно активен в лейкемических клетках, и что важно – повышенная активность коррелирует с устойчивостью к лекарственным препаратам и неблагоприятным прогнозом [182, 188, 196, 216]. Учитывая роль сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в регуляции роста, выживаемости и метастазирования клеток, молекулы этого пути являются перспективными мишенями для фармакологического вмешательства [247].

Ингибиторы, нацеленные на различные компоненты этого пути, находятся на различных стадиях клинических исследований. Изучен потенциал терапевтических агентов, которые нацелены на PI3K/Akt/mTOR путь при лечении: рака яичников [247], рака эндометрия [38, 169], глиом [5], глиобластомы [143], колоректального рака [262], холангиокарциномы [83], рака молочной железы [122], лейкемии [46]. Кроме того, в настоящее время растет понимание того, что воздействие на эти пути может влиять не только на раковые клетки, но и на иммунитет хозяина [215].

Bossler F et al. показали, что благодаря вмешательству пути PI3K/AKT/mTOR, предотвращается старение и гибель раковых клеток, содержащих вирус папилломы человека (ВПЧ). Ключевую роль играет взаимодействие mTOR пути с онкогенами ВПЧ E6/E7. Авторы рассматривают перспективу разработки ингибиторов PI3K/Akt/mTOR в качестве терапевтических средств для лечения ВПЧ-положительного рака [55].

За последнее десятилетие значительно расширилось число работ, описывающих, как вирусы модулируют метаболизм клеток-хозяев, в том числе и сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR [244].

Показано, что активация mTORC1 способствует репликации вируса гриппа, особенно на поздних стадиях вирусной инфекции, когда в клетке происходят значительные нарушения [161]. Сигнальный каскад PI3K/Akt/mTOR необходим также для поддержания и развития ротавирусной инфекции. К такому выводу авторы пришли, блокируя ключевые элементы пути, включая PI3K, mTOR and 4E-BP1, и наблюдая в результате сильный противовирусный эффект [300]. Nardacci R и соавторы показали, что при ВИЧ-инфекции вирусные белки TAT, NEF и ENV воздействуют на молекулярный путь mTOR, блокируя или стимулируя аутофагию клеток. Делается заключение, что изучение молекулярных механизмов mTOR, регулирующих гибель зараженных клеток, будет способствовать разработке новых лекарств, специфически усиливающих анти-ВИЧ ответ [204].

Опубликованы сведения об антивирусной активности ингибиторов mTOR против вирусов, которые часто реактивируются после пересадки солидных органов: ЦМВ, вирус Эпштейна-Барр (EBV), герпесвирус человека 8 (HHV8) и вирус гепатита С (HCV). Данные литературы не всегда совпадают, но указывают на потенциальное преимущество ингибиторов mTOR против вирусных инфекций [217].

Анализ опубликованных данных позволяет заключить, что понимание роли ключевых регуляторов пути PI3K/Akt/mTOR представляется необходимым для успешного развития комбинаторной терапии рака и вирусных инфекций, повышения эффективности при одновременном снижении токсичности и поиска наиболее эффективного и безопасного ингибитора PI3K/Akt/mTOR.

1.4.3. БИОГЕННЫЕ ПОЛИАМИНЫ И ИХ РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ КЛЕТКИ

Основными полиаминами (ПА) в клетках млекопитающих являются путресцин, спермидин и спермин, их химическая структура показана на рисунке 11А. Они представляют собой алифатические водорастворимые амины, которые положительно заряжены при физиологическом pH [88]. Первое открытие спермина принадлежит Левенгуку и датируется 1678 годом, однако методы, необходимые для изучения специфических функций, в которых ПА принимают непосредственное участие, стали доступны только недавно [65]. Метаболические пути ПА (синтез, взаимопревращение и катаболизм) схематически представлены на рисунке 11Б.

Первым этапом синтеза ПА является ферментативное декарбоксилирование орнитина в путресцин с помощью орнитиндекарбоксилазы (ODC). Спермидин получается из путресцина путем присоединения аминопропильной группы через спермидинсинтазу (Spermidine synthase). Спермин образуется из спермидина путем добавления аминопропильной группы, катализируемой сперминсинтазой

(Spermine synthase). В обеих реакциях донором аминопропильной группы является S-аденозил-S-метилгомоцистеин (SAMHC).

А



Б

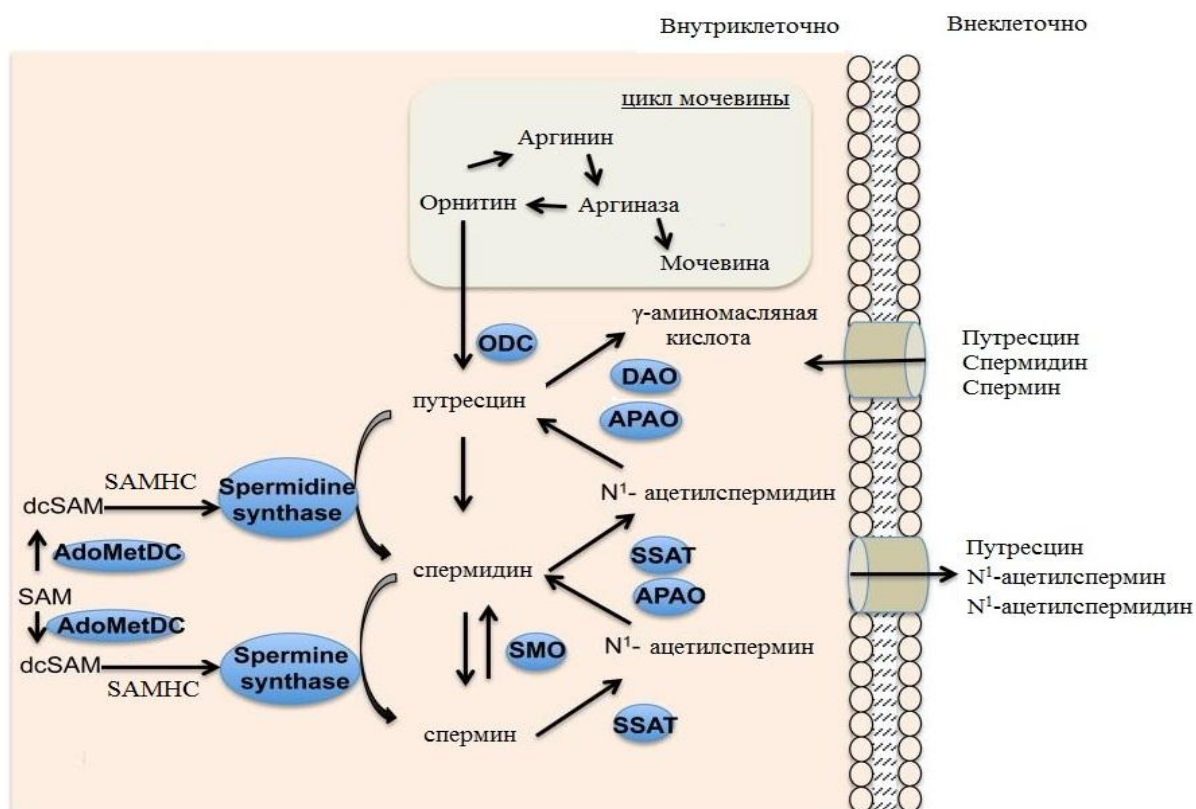


Рисунок 11. Метаболические превращения (цикл) полиаминов. (А) химическая структура путресцина, спермидина и спермина. (Б) Основные метаболиты и ферменты (выделены синим): ODC – орнитиндекарбоксилаза; Spermidine synthase – спермидинсинтаза; Spermine synthase – сперминсинтаза; SAMHC – S-аденозил-S-метилгомоцистеин; SAM – S-аденозилметионин; AdoMetDC – декарбоксилаза SAM; SSAT – спермидин /спермин ацетилтрансфераза; APAO – полиаминооксидаза; DAO – диаминооксидаза; SMO – сперминоксидаза. Рисунок адаптирован из статьи Nowotarski S. Et al. [212].

SAMHC синтезируется ферментативным декарбоксилированием S-аденозилметионина (SAM) с помощью декарбоксилазы SAM (AdoMetDC). Катаболизм полиаминов включает ацетилирование спермидин/спермин ацетилтрансферазой (SSAT). Ацетилированные производные спермидина и спермина либо соответственно превращаются в путресцин и спермидин с помощью полиаминоксидазы (АРАО), либо выводятся из клетки. Путресцин катаболизируется диаминооксидазой (DAO). Стоит отметить, что спермин может быть непосредственно окислен сперминоксидазой (SMO). Содержание полиаминов, по-видимому, строго регулируется не только во время синтеза, но и на уровне транспорта. Идентифицированные метаболические системы, сильно энергетически зависимы и демонстрируют высокую аффинность к своим субстратам (обычно в диапазоне от 10^{-7} до 10^{-5} М), при этом проникновение ПА в клетку сильно зависит от потенциала плазматической мембраны и наличия двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} и Mg^{2+} . На транспорт полиаминов также влияет pH [212, 229].

Общая внутриклеточная концентрация ПА находится в миллимолярном диапазоне, однако концентрации свободных ПА значительно ниже, поскольку они в основном связаны с различными анионами в клетке, включая ДНК, РНК, АТФ, белки и фосфолипиды [134]. Эти взаимодействия необходимы для их биологической функции. ПА участвуют во многих аспектах клеточной физиологии, таких как стабилизация ДНК/РНК, регуляция внутриклеточного pH, аутофагия, апоптоз, дифференцировка, иммунитет и старение [14, 34, 181, 195].

ПА взаимодействуют с ДНК посредством ионных взаимодействий между их аминогруппами и фосфатными группами ДНК, участвуют в ремоделировании хроматина путем модуляции ацетилирования гистонов. Эти взаимодействия необходимы для стабильности и поддержания конформации ДНК. ПА стабилизируют нуклеосомы и способствуют конденсации ДНК. Они защищают ДНК от ионизирующего излучения, активных форм кислорода и ДНКаз.

ПА участвуют в регуляции экспрессии генов, особенно тех, которые действуют в их собственном метаболизме, в выживании и пролиферации клеток.

ПА регулируют экспрессию генов на разных этапах, включая модуляцию передачи сигнала, транскрипцию и трансляцию. Спермидин регулирует образование инициаторного комплекса. ПА также связываются с тРНК, стабилизируя их структуру, взаимодействуя с фосфатными группами и нуклеиновыми основаниями, их аффинность уменьшается от спермина к путресцину. Внутриклеточные ПА в основном связаны с РНК, модифицируя структуру которых, могут модулировать синтез белка [229]. Изучение молекулярных функций ПА осложняется тем фактом, что большинство критических взаимодействий, в которые вовлечены ПА, являются легко обратимыми ионными взаимодействиями [65].

Изменение пула ПА может нарушить нормальную функцию клетки и внести вклад в развитие и прогрессирование заболевания [21, 34]. Выраженное снижение уровня полиаминов может предотвратить пролиферацию и миграцию клеток [183]. С другой стороны, избыток полиаминов приводит к апоптозу и трансформации клеток [198]. Поскольку полиамины обладают антиоксидантной активностью, снижение уровня ПА может вызывать токсические эффекты, связанные с образованием реактивных альдегидов и активных форм кислорода (АФК), что приводит к усилению окислительного стресса [221]. Это увеличивает воспалительную реакцию и вносит вклад в развитие почечной недостаточности, неврологических заболеваний и заболеваний печени [133].

Изучение ПА в раковых клетках показало нарушения метаболизма ПА в опухолях, повышение уровня ПА в раковых клетках, что указывает на их участие в злокачественной трансформации, в усилении пролиферации клеток и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [88]. Эти данные стимулировали работы по поиску ингибиторов, воздействующих на метаболизм ПА и созданию противоопухолевых агентов на их основе [42, 65]. Однако предложенные анти-ПА соединения, подавляющие биосинтез или активирующие катаболизм ПА, пока имеют ограниченный успех и не нашли широкого применения в качестве эффективных противораковых препаратов [34].

Взаимодействие ПА с вирусами и их роль в вирусных инфекциях давно интересуют исследователей. Показано, что полиамины присутствуют в некоторых вирусных частицах, в том числе в вирионах герпесвирусов, и нейтрализуют вирусные РНК [111]. При некоторых вирусных инфекциях увеличивается внутриклеточный уровень ПА [113]. ПА требуются для репликации вируса простого герпеса (ВПГ) [120]. Имеющиеся данные указывают на участие ПА в ЦМВ-инфекции на уровне сборки, упаковки или инкапсидации ДНК [112]. Снижение уровня ПА оказывает негативный эффект также на различные РНК-геномные вирусы, в том числе вызывающие недавние вспышки заболеваний – вирусы Zika и Ebola [201]. Полученные результаты показывают важность молекулярного пути ПА для репликации вирусов и открывают новые молекулярные мишени для создания противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Работы, посвященные изучению ПА в опухолевых клетках, инфицированных вирусами, практически отсутствуют. Влияние ПА на устойчивость опухолевых клеток к антибиотикам, также не изучено. В то же время более глубокое понимание связей между метаболизмом полиаминов и жизненно важными клеточными процессами будет иметь значение для понимания их роли в канцерогенезе и вирусных инфекциях, а также может быть использовано для развития новых химиотерапевтических подходов [42].

1.5. ВЛИЯНИЕ ЦМВ НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И АПОПТОЗ

ЦМВ полигистиотропен и может инфицировать различные типы клеток *in vivo* и *in vitro* [258]. Фибробласты и клетки гладких мышц обеспечивают платформу для высокого уровня литической репликации ЦМВ. Другие клетки, такие как эпителиальные и эндотелиальные клетки, поддерживают более низкие уровни репликации вируса, способствуя персистенции вируса [258], что, безусловно, согласуется с длительным выделением вируса, который, например, обнаруживается в моче внутриутробно инфицированных детей и в грудном

молоке женщин [62]. Гематопоэтические прогениторные клетки фенотипа CD34+ не поддерживают полноценную репликативную инфекцию [98, 116, 153], они служат резервуаром латентного вируса, экспрессируя только отдельные транскрипты [117]. Дифференцировка моноцитов в макрофаги восстанавливает способность клеток поддерживать активную инфекцию с выделением вируса.

Инфицирование ЦМВ моноцитов периферической крови играет ключевую роль в гематогенной диссеминации вируса в большинство органов после первичной инфекции или реактивации латентного вируса, спровоцированной дифференцировкой моноцитов в зрелые макрофаги или дендритные клетки [232]. Таким образом, поддерживается пожизненное носительство ЦМВ. Моноциты имеют короткую продолжительность жизни - 1-3 дня, что неблагоприятно для медленно реплицирующегося ЦМВ. Поскольку моноциты не являются перmissive для экспрессии и репликации вирусных генов, ЦМВ должен контролировать клеточные факторы на ранних стадиях инфекции, чтобы предотвратить апоптоз и индуцировать дифференцировку в долгоживущие макрофаги [138]. ЦМВ подавляет апоптоз не только в коротко живущих и мало чувствительных клетках, но также в высоко чувствительных к ЦМВ пролиферирующих клетках, таких как эпителиальные клетки и фибробласты. Продукты экспрессии генов ЦМВ воздействуют на различные элементы сигнальных путей апоптоза в инфицированных клетках, обеспечивая успешную персистенцию вирусов [20].

Апоптоз – запрограммированная клеточная гибель, является защитной реакцией организма на неблагоприятные воздействия, в том числе, на проникновение патогенов. В результате апоптоза изменяется морфология клетки, происходит деградация ядерной ДНК и потеря митохондриального трансмембранного потенциала. Этот процесс опосредуется последовательным протеолитическим расщеплением и активацией каспаз, семейства цистеиновых протеаз, которые нацелены на остатки аспартата в своих субстратах. Фрагментация ДНК, которая характерна для апоптотической гибели клеток, опосредуется тремя эффекторными каспазами: каспазой-3, каспазой-6 и каспазой-

7 [147, 192]. Согласно рекомендациям Номенклатурного Комитета по Гибели клетки в 2012 г апоптоз классифицирован на внешний, который инициируется главным образом в ответ на внеклеточные сигналы и происходит через активацию трансмембранных рецепторов, и на внутренний, который возникает в результате внутриклеточных процессов [109].

Хотя внешние и внутренние пути апоптоза могут быть независимо определены на молекулярном уровне, имеются существенные доказательства перекрестных связей между двумя путями [239]. Важно, что при заражении ЦМВ могут запускаться как внешние, так и внутренние пути апоптоза в ответ на активацию Toll-подобных рецепторов (TLRs), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), интегринов и других рецепторов [109, 222].

Внешний апоптоз возникает после передачи «сигнала смерти» из внеклеточной среды в клетку. «Сигнал смерти», запускаемый ЦМВ, может передаваться через рецепторы смерти плазматической мембраны, которые активируются в ответ на связывание их родственными лигандами (например, Fas-лиганд (FasL)/Fas-рецептор (FasR), фактор некроза опухоли α (TNF- α)/фактор некроза опухоли α рецептор 1 (TNFR1), Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 и Apo2L/DR5) [80]. Активация этих рецепторов приводит к сборке мультибелкового комплекса (например, сигнального комплекса, индуцирующего смерть, DISC), который регулирует расщепление и активацию инициаторных каспаз (каспаза-8 и каспаза-10). Затем полностью активные инициаторные каспазы управляют протеолитическим расщеплением и активацией эффекторных каспаз (каспаза-3 и каспаза-7) [147].

Внутренний апоптоз возникает в ответ на физиологический дисбаланс в клетке, вызванный ЦМВИ. Активация каспаз на внутреннем пути контролируется на митохондриальной мембране членами семейства белков Bcl-2 [85, 199]. Во время внутреннего апоптоза сначала активируется инициаторная каспаза-9, а затем активируются каспаза-3 и каспаза-7 [149]. Образование проапоптотических димеров можно предотвратить посредством связывания антиапоптотических белков семейства Bcl-2 (например, Mcl-1 и Bcl-2) с проапоптотическими белками;

таким образом, соотношение антиапоптотических и проапоптотических белков в данной клетке определяет ее судьбу [252]. Вирусные гликопротеины gB и комплекс gH/gL связываются со своими рецепторами, рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и $\beta 1/\beta 3$ -интегринами, соответственно, что приводит к транскрипции клеточных антиапоптотических факторов, таких как Mcl-1 [68] и Bcl-2 [81]. Вирусная регуляция экспрессии Mcl-1 и Bcl-2 обеспечивает строгий контроль над функцией каспаз во время инфекции, позволяя вирусу не только контролировать выживание клеток, но и прямую дифференцировку моноцитов в макрофаги [69].

Одним из первых идентифицированных белков ЦМВ, обладающих антиапоптотической функцией, был pUL36. Антиапоптотическая функция pUL36 была обнаружена в клетках HeLa при скрининге библиотеки экспрессии ЦМВ для белков, способных блокировать Fas-индуцированный апоптоз. Также было обнаружено, что pUL36 предотвращает апоптоз, запускаемый TNF- α и TRAIL (TNF-связанный индуцирующий апоптоз лиганд). pUL36 взаимодействует с прокаспазой-8 и ингибирует его протеолитический процессинг, поэтому pUL36 называют вирусным ингибитором апоптоза, индуцированного каспазой-8 (vICA). В частности, vICA взаимодействует с про-доменом каспазы-8 и ингибирует его саморасщепление и созревание [259], предположительно, блокируя взаимодействие каспазы-8 с адаптерным белком FADD [63]. vICA играет важную роль в выживании инфицированных клеток. Ген *UL36* ЦМВ может быть необязательным для репликации в фибробластах [220], но, по-видимому, необходим для эффективной репликации в дифференцированных клетках линии моноцитов-макрофагов. Каспаза-8 может быть критической для дифференцировки моноцитов в макрофаги [191], таким образом, может иметь место сложное взаимодействие между pUL36 и каспазой-8 при длительной инфекции миелоидных клеток ЦМВ.

Антиапоптотическую функцию выполняют также белки, кодируемые вирусным геном *UL37*. Ген кодирует предположительно 6 изоформ белка *UL37*. При перmissive ЦМВИ на ранних стадиях преимущественно продуцируется один

из белков, который получил название *vMIA* – вирусный митохондриальный ингибитор апоптоза, так как он перемещается вначале в эндоплазматический ретикулум и затем импортируется в митохондрии [57]. Белок *vMIA* блокирует высвобождение цитохрома *C* из митохондрий, предотвращая проницаемость наружной мембраны митохондрий, и блокирует созревание прокаспазы-9 до активной каспазы-9 [190]. Считается, что молекулярный механизм антиапоптотической активности *vMIA* заключается в его способности взаимодействовать с *Bax* и/или *Bak* для предотвращения проапоптотической функции этих белков в митохондриях [105, 211].

Белок *pUL38* выполняет две функции: антиапоптотическая активность и активация синтеза белка, которая улучшает жизнеспособность клеток. Показано, что ген *UL38* кодирует белок, ингибирующий гибель клеток, путем ингибирования фосфорилирования *JNK* [227]. Независимо от своей способности предотвращать смерть клеток, вызванную эндоплазматическим стрессом (ER-стрессом), *pUL38* также может регулировать синтез белка. Показано, что *pUL38* способен индуцировать *mTORC1*, что также может улучшать жизнеспособность клеток [193, 227].

IE1-p72 и *IE2-p86* основные сверххранние вирусные белки ЦМВ, механизмы антиапоптотической активности которых до конца не изучены. *IE1-p72* и *IE2-p86*, по-видимому, не вмешиваются в митохондриальные апоптотические процессы [307], однако они могут активировать путь *PI3K/Akt/mTOR* [146] (рисунок 12).

Основные *IE* белки также могут влиять на экспрессию генов хозяина и нарушать регуляцию множественных сигнальных путей [146]. Таким образом, *IE* белки играют очень сложную роль в регуляции синтеза белка и, вероятно, контролируют процесс апоптоза с помощью множества механизмов. *UL37* кодирует очень мощный митохондриальный супрессор клеточной гибели, *vMIA*. Этот небольшой белок локализуется на внешней мембране митохондрий и изолирует *Bax* и *Bak*, но не предотвращает олигомеризацию этих представителей семейства *Bcl2*.

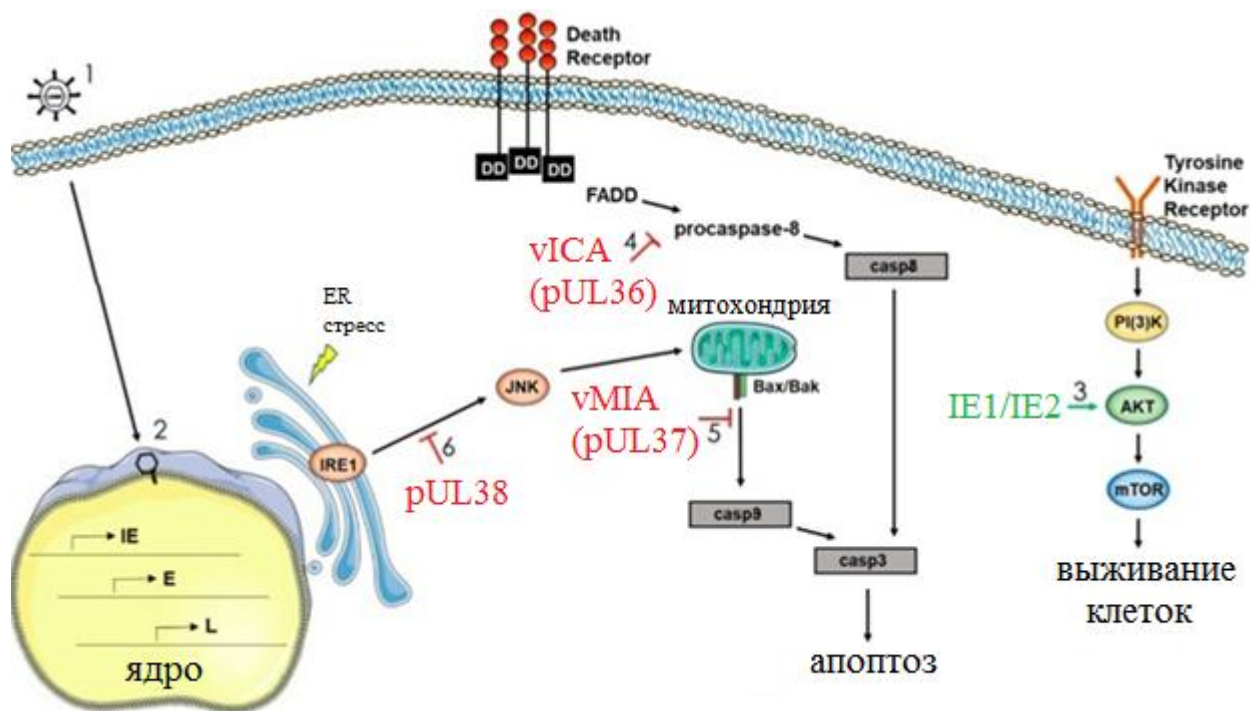


Рисунок 12 . Антиапоптозные функции белков ЦМВ. Рисунок адаптирован из статьи D. Collins-McMillen [80]. 1) проникновение ЦМВ в клетку; 2) транслокация ЦМВ в ядро и инициация экспрессии вирусных генов; 3) IE1-p72 и IE2-p86 активируют сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR путем фосфорилирования Akt; 4) Белок vICA (pUL36) связывается с прокаспазой-8, блокирует его протеолитическое расщепление и активацию клеточной гибели; 5) vMIA (pUL37x1) связывается с Вах и Вак для предотвращения проницаемости внешней мембраны митохондрий и индукции каскада активации каспаз; 6) pUL38 подавляет апоптоз, вызванный стрессом эндоплазматического ретикулаума (ER), вероятно, посредством ингибирования фосфорилирования JNK.

Через взаимодействие с Вах, Вак, BclxL и членов семьи GADD45, vMIA предотвращает высвобождение цитохрома С, что является ключевым шагом в активации каспазного пути апоптоза. vMIA ассоциируется с эндоплазматическим ретикулумом (ЭПР) – являясь производным митохондриально-ассоциированных мембран, увеличивает высвобождение запасов кальция ЭПР и усиливает клеточное округление и, как следствие, vMIA связан с ЦМВ-зависимым цитопатическим эффектом, опосредованным через вирепин (RSAD2). Хотя vMIA является очень мощным ингибитором апоптоза, его роль в ЦМВИ также заключается в предотвращении митохондриального HtrA2 серин-протеазного

пути клеточной гибели, который прерывает цикл репликации вируса в фибробластах. *vMIA* может быть необходим для репликации ЦМВ (например, штамм AD169) или необязателен для репликации (например, штамм Towne). Продукты гена *UL37×1* – это небольшие митохондриальные ингибиторы *Bax* и *Bak*, эволюционно консервативные для бета-герпесвирусов.

UL36, представитель семейства *US22*, кодирует вирусный ингибитор активации каспазы 8 (*vICA*). *vICA* подавляет рецептор-зависимый апоптоз, играющий важную роль в ответе макрофагов на вирусную инфекцию, но, видимо, несущественный для репликации в других типах клеток. *UL36* мутирует в обычно используемых штаммах ЦМВ. *vICA* связывается с прокаспазой 8 и тем самым препятствует расщеплению и/или активации, по механизму схожему с действием длинной формы клеточного *FLICE* (другое название каспазы 8) ингибирующего белка (*cFLIPL*). *vICA* высоко консервативен, присутствует у всех бета-герпесвирусов. Вирусы, при недостатке *vICA* хорошо реплицируются в фибробластах, но аттенуируют из-за восприимчивости к рецептор-зависимому апоптозу в макрофагах. Эволюционное приобретение множества супрессоров клеточной гибели в ЦМВ облегчило идентификацию запрограммированной клеточной гибели как защитного механизма, который развивается для защиты от вирусов.

IRS1 и *TRS1* являются высоко гомологичными представителями семейства *US22*, которые ингибируют интерферон-индуцируемую протеинкиназу *R* (*PKR*), либо поддерживают вирусную репликацию. Независимо от *PKR*, *TRS1* ингибирует макроаутофагию, и *TRS1*, более чем *IRS1*, может влиять на экспрессию *E* гена, синтез ДНК и сборку капсида, что, в конечном счете, может быть связано с ингибированием *PKR*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Анализ данных литературы показывает, что в настоящее время достаточно хорошо изучено строение ЦМВ, патогенез и виды ЦМВИ. Но до конца не изучены функции вирусных генов и белков. Активно изучаются ключевые факторы перехода литической инфекции в латентную, однако многое остается невыясненным. Важное значение имеют исследования, направленные на детальный анализ реактивации ЦМВ в клетках разного происхождения при внешних и внутренних воздействиях на клетки и организм, многие вопросы в этом направлении предстоит решить в дальнейших работах.

Разработаны и предложены стратегии лечения рака путем воздействия на транскрипционные факторы, такие как p73 и E2F1. Апробируется и уже используются ингибиторы метаболизма полиаминов и mTOR в комплексной и монотерапии некоторых видов рака. Но, несмотря на имеющиеся положительные результаты лечения, данные противоречивы и при многих заболеваниях эффективность пока невысока. Так, использование препарата первой линейки выбора - ДОКС, при лечении лейкемии дает положительный эффект в 40% случаев. Одна из основных причин - резистентность к химиотерапии, признается важнейшей проблемой в лечении опухолевых заболеваний. Несмотря на многочисленные исследования молекулярных и клеточных механизмов резистентности преодолеть лекарственную устойчивость к антибиотикам во многих случаях пока не удастся.

Мы обратили внимание на значительное количество опубликованных работ, в которых сообщается об обнаружении ДНК и белков ЦМВ в различных видах опухолей. Можно было предположить, что ЦМВ инфекция вносит вклад в формирование резистентности опухолевых клеток к противоопухолевым антибиотикам. На примере солидных опухолей нейронального происхождения (нейробластомы, глиомы) было показано, что заражение ЦМВ снижает эффективность химиотерапии, однако для гематологических опухолей данные отсутствовали или были скудными. Опубликованные данные о действии ДОКС на

ранние стадии ЦМВИ в клетках моноцитарной лейкемии THP-1 давали основания для выбора этой модели для изучения роли активной и латентной ЦМВИ в установлении резистентности клеток лейкемии к антибиотику. Для преодоления резистентности к противоопухолевым антибиотикам необходимо понять клеточные и молекулярные механизмы, влияющие на чувствительность клеток. В опубликованных работах содержатся сведения о молекулярных путях и метаболических циклах, участвующих в поддержании жизнеспособности клеток в условиях неблагоприятных воздействий. Однако сведения о вкладе биогенных полиаминов в метаболизм ЦМВ-инфицированных клеток THP-1 после обработки ДОКС, практически отсутствовали. Недостаточно изученными оставались также многие вопросы, связанные с влиянием ферментов молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR на резистентность к ДОКС клеток лейкемии, инфицированных ЦМВ. В то же время получение таких сведений необходимо для определения мишеней, на которые можно воздействовать для восстановления чувствительности к химиотерапии раковых клеток гематологического происхождения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. ОСНОВНЫЕ РЕАКТИВЫ

Список основных реактивов и препаратов, использованных в работе, а также фирмы-производители:

Среда DMEM, ПанЭко (Москва);

Среда RPMI 1640, ПанЭко (Москва);

Эмбриональная телячья сыворотка, Hy Clone (США);

Эмбриональная телячья сыворотка, Gibco, Thermo Fisher Scientific (США)

Доксорубицин, Sigma (США);

Антитела к каспазе 3 (ab52293), Abcam (Великобритания);

Антитела к каспазе 8 (ab4052), Abcam (Великобритания);

Антитела к каспазе 9 (ab32539), Abcam (Великобритания);

Антитела к IE1-p72 (30924), Abcam, (Великобритания);

Антитела к pp65 (31624), Abcam, (Великобритания);

Антитела к gB (20783), Abcam, (Великобритания);

Антитела к p73 (17230), Abcam, (Великобритания);

Антитела к E2F1 (135251), Abcam, (Великобритания);

Антитела к β -актину (8229), Abcam, (Великобритания);

Антимышинные иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена (P02602), Dako (Дания);

Козьи антикроличьи поликлональные антитела, конъюгированные с флюорохромом FITC (ab98502), Abcam (Великобритания);

Козьи антимышинные поликлональные антитела, конъюгированные с флюорохромом Cy-3 (ab97036), Abcam (Великобритания);

Краситель DAPI, Sigma (США);

Набор DeadEndTM Colorimetric TUNEL System, Promega (США);

Мовиол, Calbiochem (США);

Диаминобензидин (DAB), Biosciences (США).

2.2. КЛЕТКИ

Клетки линии ТНР-1 и ФЛЭЧ (фибробласты легкого эмбриона человека) были получены из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Клетки ТНР-1 выращивали на среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Москва) в CO₂-инкубаторе (Sanyo CO₂-incubator MCO-15AC, Япония) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки ФЛЭЧ выращивали в среде DMEM с 10% ЭТС в тех же условиях, что и клетки ТНР-1. Пассирование фибробластов осуществляли дважды в неделю, а ТНР-1 каждые 2-3 дня. Клеточные культуры не содержали контаминирующие внеклеточные и внутриклеточные микроорганизмы.

2.3. ОБРАБОТКА ДОКС КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ

Для оценки влияния ДОКС на культуру ЦМВ-инфицированных клеток ТНР-1 клетки заражали вирусом с инфекционной множественностью 3-5 БОЕ/кл. ЦМВ-инфицированные клетки высаживали в культуральные флаконы в концентрации 500×10^3 клеток в 1 мл. Через 4 часа после инфицирования в клетки вносили 5 мкг/мл ДОКС и инкубировали 24 часа. После 24-часовой инкубации с ДОКС (через 28 часов после заражения ЦМВ, далее 1 сутки ЦМВИ) действие ДОКС изучали с помощью методов, описанных ниже. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз.

2.4. ВИРУС

Цитомегаловирус человека (ЦМВ) штамм AD 169 получен из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вирус поддерживали путем пассирования на культуре клеток ФЛЭЧ. Фибробласты заражали с инфекционной множественностью 5 БОЕ/клетку.

Адсорбцию вируса проводили в течение 1 часа при 37°C. Затем вносили поддерживающую среду DMEM с 2% сыворотки. Инфицированные клетки инкубировали при 37°C до выявления признаков цитопатогенного действия (ЦПД). Сбор вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) производили при выявлении 90% ЦПД в монослое (обычно через 1-2 недели). Для освобождения от фрагментов клеточного детрита ВСЖ центрифугировали при 17000 g в течение 15 мин. на центрифуге 21-B, ротор JA-14 (Beckman). В полученной ВСЖ определяли инфекционную активность вируса.

2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА

Определение инфекционной активности вируса проводили в 48-луночных планшетах (Costar, США) методом «черных» бляшек. Для этого готовили пробы ВСЖ с возрастающими десятикратными разведениями. Приготовленные пробы в объеме 100 мкл наносили на монослой клеток ФЛЭЧ в 48-луночных панелях. Инкубировали в течение 1 часа, промывали и вносили среду поддержки, содержащую 2% ЭТС. После инкубации в течение 5 суток при 37°C, клетки промывали 0,1 М фосфатно-солевым буфером, pH 7,4, (ФСБ) и фиксировали в охлажденном метаноле (-20°C) в течение 20 мин. Очаги инфицированных клеток (бляшек) выявляли иммуноцитохимическим методом с использованием смеси мышинных моноклональных антител (МКА) к сверхраннему вирусному белку IE1-p72 в разведении 1:1000 и раннему белку pp65 в разведении 1:500 и антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:500). Окрашенные бляшки идентифицировали и подсчитывали с помощью светового микроскопа AxioCamMRC 5, Zeiss, (Германия). Титр вируса выражали в количестве бляшкообразующих единиц, содержащихся в 1 мл неразведенной ВСЖ. Титр вируса составлял не менее $1-5 \times 10^5$ БОЕ/кл.

2.6. ИНФИЦИРОВАНИЕ ЦМВ КЛЕТОК ТНР-1

Клетки ТНР-1 осаждали центрифугированием 10 мин при 400 g. На осадок клеток наносили ВСЖ из расчета заражения 5 БОЕ/кл. и ресуспензировали. Инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем клетки центрифугировали при 400 g, 10 мин. отбирали супернатант с интактным вирусом и ресуспензировали в поддерживающей среде (RPMI 1640 с 2 % ЭТС). Контрольные (неинфицированные клетки) обрабатывали также с использованием культуральной жидкости от неинфицированных клеток ФЛЭЧ. Инфицированные и контрольные клетки рассаживали в культуральную посуду в концентрации 500 тыс./мл.

2.7. ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ЦМВ

В инфицированных клетках ТНР-1 выявляли сверхранний IEp72, ранний pp65 и поздний структурный gB белки ЦМВ методом иммунофлюоресцентного окрашивания. Для этого клетки ТНР-1 инфицировали ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/кл. Через 4 часа, 1 сут., 2 сут., 3 сут., 7 сут. и 14 сут. после заражения клетки отбирали, дважды промывали ФСБ (0,1 М, р 7,4), наносили на предметные стекла и фиксировали охлажденным ацетоном, -20°C, 10 мин.

На препараты фиксированных клеток наносили МКА, специфичные к вирусным белкам IE1-p72 (1:1000), раннему белку pp65 (1:500) и позднему белку gB (1:500) и инкубировали, в течение 1 часа при 37°C. В качестве вторых антител применяли козы антимышинные поликлональные антитела, конъюгированные с флюорохромом Cy-3 (1:500). Ядра клеток окрашивали ДНК-тропным красителем DAPI в концентрации 1 мкг/мл. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного/светового микроскопа Olympus BX-51 (Япония). Проводили подсчет окрашенных и неокрашенных клеток, долю клеток, содержащих вирусный белок, выражали в процентах от общего количества клеток.

2.8. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТА

Опытные и контрольные клетки ТНР-1 отбирали и промывали ФСБ (0,1 М, р 7,4), центрифугируя при 17000 g, 10 мин. Осадок клеток лизировали коммерческим буфером (RIPALysisBufferKit, Santa Crus Biotechnology) на хладагенте. В клеточных лизатах измеряли концентрацию белка по методу Бредфорда с использованием коммерческого красителя бриллиантовый голубой Р (Sigma, США). Для проведения электрофорезного разделения белков в лизаты клеток вносили буфер для образцов, в соотношении (1:2) содержащий 2-меркаптоэтанол, SDS.

Электрофорез (ЭФ) белков проводили в 12% полиакриламидном геле с применением буферной системы для SDS-электрофореза по Лэммли. Для этого использовали ячейку для электрофореза Mini-PROTEAN 3 cat. № 165-330 (Bio-Rad, США). ЭФ проводили согласно методике, описанной в инструкции фирмы производителя. Для контроля молекулярного веса использовали маркеры молекулярного веса фирмы Abcam cat. № 116027

После проведения ЭФ белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 мкм, Schleicher&Schuell, Германия). Перенос белков проводили в мини ячейке MiniTrans-Blot (Bio-Rad, cat. № 170-3930) в соответствии с инструкцией по эксплуатации от фирмы производителя. Эффективность переноса белков контролировали окрашиванием мембраны 2% раствором Ponceau S (Amresco, США) в течение 30 мин.

Далее мембрану инкубировали 12 часов при 4°C в блок-растворе, содержащем 5% сухого молока, 0.1% Tween-20 в ФСБ (ФСБТ). После блокировки мембрану помещали в блок-раствор с МКА к белкам ЦМВ (IE1-p72, pp65 и gB в разведении 1:1000, 1:500 и 1:500, соответственно) или к клеточным белкам (p73, E2F1 и β -актин в разведении 1:250, 1:500 и 1:500, соответственно) и инкубировали в течение 1,5 часов при комнатной температуре. Не связавшиеся МКА отмывали ФСБТ 5 раз по 5 мин. Затем на мембрану наносили поликлональные кроличьи анти-мышинные иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена в рабочем

разведении 1:1000. Инкубировали 1 час при комнатной температуре и отмывали 5 раз по 5 мин в ФСБТ. Для выявления комплекса антиген-антитело использовали субстрат ClarityTMWesternECL (cat. №1705060 Bio-Rad), который люминесцирует после взаимодействия с ферментом пероксидазой хрена. Для детекции сигнала хемилюминесценции на мембране экспонировали зеленочувствительную рентгеновскую фотопленку (cat. №126041, Carestream, США). Пленку проявляли с использованием проявителя и фиксажа фирмы ВИПС-МЕД (Россия) согласно методике фирмы-производителя.

2.9. АНАЛИЗ МРНК ВИРУСНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ ГЕНОВ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли из клеток с использованием реагента Тризол (Invitrogen), и для определения концентрации и чистоты РНК использовали УФ-спектрофотометр (NanoDrop ND-1000, ThermoFisherScientific, МА, США). Одна микрограмм суммарной РНК была обратно транскрибирована кДНК с использованием обратной транскриптазы MultiScribe (AppliedBiosystems, FosterCity, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Продукт реакции сохраняли при -20 °С. Подбор условий и написание праймеров проводили при использовании карты генома ЦМВ штамма AD169, программы VectorNTI8, сервиса The mfold Web Server (University at Albany), Primer-BLAST (NSBI) (таблица 3).

Таблица 3. Праймеры и условия амплификации для ПЦР.

Гены	Праймеры	Условия амплификации для ПЦР*	
		Тем-ра отжига, °С	Время отжига, сек
<i>UL138</i>	F:CGTACTCCCCGTACAGCTCGCAAC R:CTGGCTTACCACTGGCACGACACC	69	20

<i>UL82</i>	F:GTCCGTCTCCGTTTTGTGGATGT R:GCAGTTTGGAGGCAGGGCAGAT	64	20
<i>UL122</i>	F:TCATGTTGCGGTAATCGGAGGAACG R:CACAGCCGATGCTTGTAACGAAGG	68	20
<i>UL54</i>	F:GCGTACCGTTGAAAGAAAAGCATAAAGC R:GCACTTCGGAGGGTGTGATCTTTGG	64	20
<i>UL83</i>	F:TGCCCTGGATGCGATACTG R:AGGACCTGACGATGACCCG	56	25
<i>GUS</i>	F:CGTGGTTGGAGAGCTCATTTGGAA R:ATTCCCCAGCACTCTCGTCGGT	64	20

*Температура денатурации - 97°C (20 сек.), температура элонгации - 72°C (20 сек.), количество циклов - 50 для всех используемых праймеров.

Синтез олигонуклеотидов (праймеров) заказан у компании Евроген. Реакции RT-qPCR проводились с ПЦР-миксом от компании Синтол (2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green). Для проведения qPCR применяли LightCycler® 480 System (Roche).

2.10. ДНК-ДНК ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU

Клетки ТНР-1 инфицировали ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/кл. как указано выше. Через 24 часа, 5 суток и 7 суток после инфицирования клетки дважды промывали в ФСБ, наносили на предметные стекла с использованием цитоцентрифуги (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Германия), фиксировали охлажденным метанолом в течение 30 мин., высушивали. Перед проведением гибридизации препараты клеток промывали ФСБ, обрабатывали 3%-м раствором перекиси водорода в течение 15 мин, протеиназой К (Dako) (1,5 мин.), глицином на ФСБ (2 мг/мл, 5 мин.), проводили дегидратацию спиртовыми растворами, высушивали 5-10 мин при 37°C.

Затем наносили гибридизационный буфер с биотинилированной ДНК ЦМВ (1 мкг/мл, EnzoLifeSciences, USA). Препараты накрывали покровными стеклами и нагревали 5 мин при 95°C. После этого инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Покровные стекла удаляли и препараты помещали в промывочный буфер на 2-5

мин. при комнатной температуре. Затем на клетки наносили постгибридизационный реагент и инкубировали 10 мин. при температуре 37°C.

Для детекции гибридизационной метки использовали UltraSensitiveEnhanced Hrp-DAB in situ detection system (Enzo) согласно инструкции производителя. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Olympus (ок.10х, об.100х), (Япония).

2.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННО АКТИВНОГО ВИРУСА В КЛЕТКАХ ТНР-1, ЗАРАЖЕННЫХ ЦМВ

В различные сроки после заражения отбирали культуральную жидкость от ТНР-1 и вносили в чувствительные клетки ФЛЭЧ. Пробы культуральной жидкости отбирали, начиная с 3-х суток после инфицирования до 14 суток. Инфекционную активность вируса определяли методом «черных» бляшек, как указано разделе «Определение инфекционной активности вируса».

2.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКС НА НЕИНФИЦИРОВАННЫЕ ТНР-1 КЛЕТКИ

Цитотоксичность определяли по влиянию на жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего (dyeexclusiontest). Для этого клетки ТНР-1 высаживали в 24 луночные панели в концентрации 500×10^3 /мл. Затем в клетки вносили ДОКС в концентрациях 0,5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 5,0 мкг/мл и 10 мкг/мл и инкубировали в течение 24 часов. После инкубации в опытных и контрольных культурах проводили подсчет жизнеспособных клеток после окрашивания 0,4% раствором трипанового синего ("ПанЭко", Россия) в течение 5 мин. Количество нежизнеспособных (окрашенных) и жизнеспособных (неокрашенных) клеток проводили в камере Горяева.

Методом линейной регрессии с использованием пакета документов MicrosoftExcel была рассчитана концентрация ДОКС, при которой погибает 50% клеток ($ЦД_{50}$).

2.13. МТТ-ТЕСТ

Цитотоксичность ДОКС, MDL72.527, DFMO, рапамицина и Торина2 также была определена с помощью МТТ-теста. После инкубации с соединениями в каждую лунку было добавлено 20 мкл МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (5 мг/мл) (Sigma-Aldrich) и планшеты дополнительно инкубировали в течение 2 часов. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл закисленного изопропанола (0,04 Н•HCl) для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора Antos 2010 (Austria) определяли оптическую плотность при 530 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50 % гибель клеток ($ЦД_{50}$), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.

Сравнительный анализ данных, полученных в МТТ-тесте и методом исключения витального красителя трипанового синего, показал, что различия между значениями не были статистически значимы ($p > 0,05$).

2.14. ДЕТЕКЦИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКС НА ТНР-1 КЛЕТКИ, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦМВ

Клетки ТНР-1 заражали ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/кл. как указано выше в разделе «Инфицирование ЦМВ клеток ТНР-1». Инфицированные и контрольные (неинфицированные) клетки рассаживали в культуральную посуду в концентрации 500×10^3 кл/мл. Через 4 часа, 24 часа и 7 с.п.и. в инфицированные и неинфицированные клетки вносили 5 мкг/мл ДОКС и инкубировали в течение 24 часов. После инкубации в опытных и контрольных культурах клетки окрашивали

0,4% раствором трипанового синего ("ПанЭко") в течение 5 мин. Количество нежизнеспособных (окрашенных) и жизнеспособных (неокрашенных) клеток проводили в камере Горяева. Методом линейной регрессии с использованием пакета документов MicrosoftExcel была рассчитана концентрация ДОКС, при которой погибает 50% клеток ($ЦД_{50}$). $ЦД_{50}$ было получено и МТТ-тестом, по методике, описанной выше в разделе «МТТ-тест». Данные, полученные обоими методами, не отличаются статистически значимо ($p > 0,05$)

2.15. ВЫЯВЛЕНИЕ ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ДНК IN SITU

Контрольные и опытные клетки промывали центрифугированием в ФСБ. Далее 100 мкл клеточной суспензии с концентрацией $300-500 \times 10^3/\text{мл}$ наносили на предметные стекла и фиксировали 3%-м раствором параформальдегида (cat. А-3813, AppliChem, Германия) на ФСБ в течение 20 мин. при комнатной температуре. Затем фиксированные клетки обрабатывали 20 мин 0,1% Тритон Х-100 в ФСБ для пермеабилзации клеточных мембран. Для обнаружения нуклеосомных разрывов ДНК использовали коммерческий набор DeadEndTMFluorometricTUNELSystem (cat. № G3250, Promega, США). Реакцию проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Препараты анализировали во флюоресцентном микроскопе x10 ок., x100 об. (Ziess, Германия). Долю положительно окрашенных клеток, содержащих разрывы ДНК, выражали в процентах от общего количества клеток.

2.16. ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА МЕТОДОМ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

В качестве маркеров апоптоза были использованы активированные каспазы 3, 8 и 9. Выявление проводили в реакции непрямой иммунофлюоресценции in situ с использованием специфических антител, направленных к белкам-маркерам. Для

проведения реакции клетки фиксировали охлажденным метанолом, как указано выше. После промывки ФСБ фиксированных препаратов, на клетки наносили раствор специфических антител в ФСБ, содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина. Инкубировали в течение 1 часа при 37° С. Для выявления каспаз использовали антитела к каспазе 3, 8 и 9 в разведении 1:50, 1:50 и 1:100, соответственно. После инкубации с первичными антителами препараты клеток промывали и затем инкубировали со вторичными антителами в течение 30 мин при 37° С. В качестве выявляющих антител использовали козы антикроличьи поликлональные антитела, конъюгированные с флюорохромом Cy-3 в разведении 1:1000. Ядра клеток окрашивали ДНК-тропным красителем DAPI в концентрации 1 мкг/мл. Препараты с клетками заключали в мовиол и изучали во флюоресцентном микроскопе x10 ок., x100 об. (Zeiss, Германия). Долю положительно окрашенных клеток, содержащих активированные каспазы, выражали в процентах от общего количества клеток.

2.17. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoftInc., США). Все данные представлены в виде среднего $\pm$ SD, $n \geq 3$. Различия между группами сравнивались с помощью двустороннего критерия Стьюдента. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦМВ ИНФЕКЦИИ В КЛЕТКАХ ТНР-1

3.1. ВЛИЯНИЕ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ (ЦМВИ) НА МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК ТНР-

1

ТНР-1 представляют собой суспензионную клеточную линию (рисунок 13А), полученную от годовалого мальчика, больного острой моноцитарной лейкемией [70].

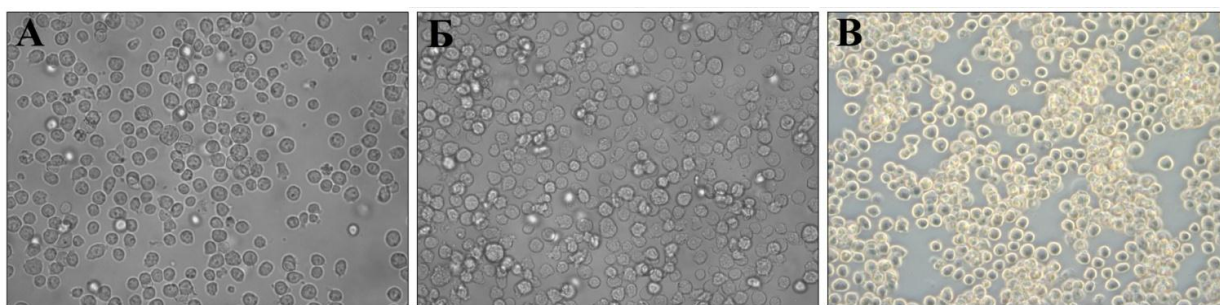


Рисунок 13. (А) Клетки ТНР-1; (Б) Клетки ТНР-1 в 1 с.п.и. ЦМВ; (В) Клетки ТНР-1 в фазовом контрасте. Увеличение 400х.

Морфологический анализ суспензионных клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ с инфекционной множественностью 5 БОЕ/кл, проводили в течение 14 суток. Морфологически неинфицированные и инфицированные клетки ТНР-1 не отличались в первые сутки после заражения (с.п.и.), однако количество клеток снижалось (рисунок 13Б). На вторые сутки инфицированные клетки не образовывали гроздя, характерные для неинфицированной суспензионной культуры клеток ТНР-1 (рисунок 13В). На пятые сутки после инфицирования в клетках появлялись цитоплазматические вакуоли. На 9 сутки ЦМВИ инфицированные клетки визуально уменьшались в диаметре. Изучение размеров клеток с помощью прибора «ChemometecNucleoCounter NC-200 (Дания) показало, что на 10-14 сутки среднее значение диаметра зараженных клеток составило $11 \pm 0,20$ мкм, незараженных ТНР-1 – $13 \pm 0,25$ мкм ($p < 0,0001$).

3.2. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ

Влияние вируса на жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего. В инфицированной популяции ТНР-1 концентрация клеток снижалась на $32 \pm 1,9\%$ ($p < 0,05$) и составляла $340 \pm 20 \times 10^3$ /мл в первые сутки после заражения, в то время как в контрольной неинфицированной культуре отмечали увеличение концентрации клеток в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с исходной концентрацией (500×10^3 /мл $\pm 43 \times 10^3$ /мл). За 2-3 дня количество клеток в контрольной популяции достигало 1200×10^3 /мл $\pm 300 \times 10^3$ /мл. Инфицированная культура росла медленно, и к 14 сут культивирования концентрация клеток составляла $574 \pm 38 \times 10^3$ /мл ($p > 0,05$).

3.3. ИЗМЕНЕНИЕ ДОЛИ КЛЕТОК ТНР-1, СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКИ ЦМВ, В ДИНАМИКЕ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ

Для характеристики течения ЦМВИ в клетках лейкемии человека ТНР-1 определяли вирусспецифические белки, характеризующие сверхраннюю (IE), раннюю (E) и позднюю (L) стадии жизненного цикла вируса. На рисунке 14 в качестве примера продемонстрирована иммуофлюоресцентная окраска *in situ* ЦМВ-инфицированных клеток ТНР-1 с использованием МКА, направленных к сверхраннему IE1-p72, раннему pp65 и позднему gB белкам ЦМВ.

Подсчет положительно окрашенных (красная флюоресценция) клеток показал, что количество клеток, экспрессирующих сверхранние и ранние вирусные белки через 4 часа после инфицирования составляло около 4% и не изменялось в течение первых суток ($p > 0,05$). На протяжении вторых и третьих суток наблюдалось снижение количества клеток, содержащих IE1-p72 и pp65 ($p < 0,05$), и на 7 сутки клетки, содержащие эти белки, не были обнаружены.

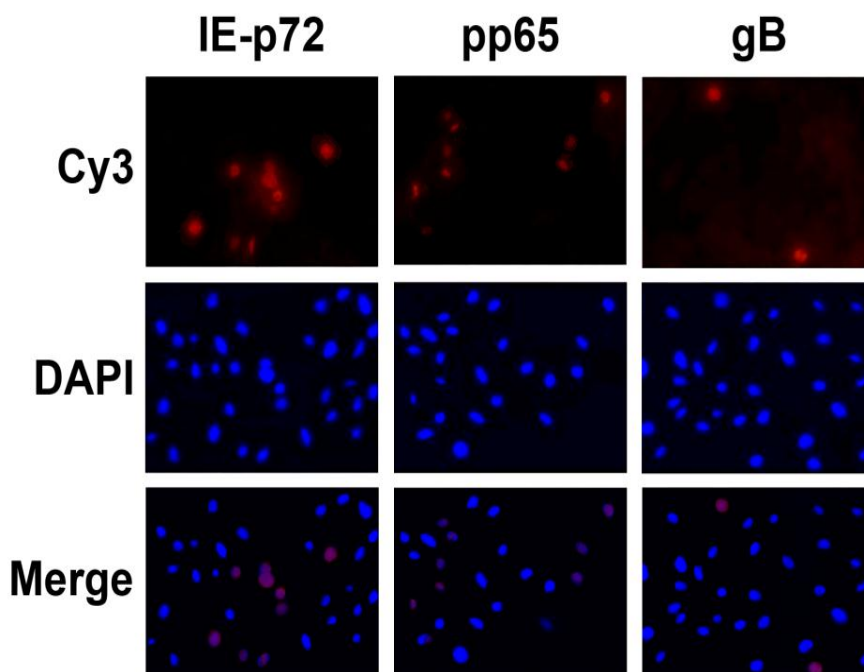


Рисунок 14. Выявление белков ЦМВ методом иммунофлюоресценции на 2 сут после инфицирования. 1 ряд – Окраска МКА к вирусным белкам, 2 ряд - та же культура, окраска ядерным красителем DAPI, 3 ряд – совмещение окраски МКА и DAPI.

Клетки, окрашенные МКА к позднему белку gB, определялись, начиная со 2 суток после инфицирования, их количество увеличилось к 3 сут ($p < 0,05$), но к 14 суткам после инфицирования клетки, содержащие gB, обнаружены не были (таблица 4).

Таблица 4. Иммуноцитохимическое выявление вирусных белков в клетках ТНР-1, инфицированных ЦМВ.

Вирусные белки	Время после заражения					
	4 часа	1 сут.	2 сут.	3 сут.	7 сут.	14 сут.
IE1-p72	4.5±0.4*	4.2±0.7	2.3±0.5	1.4±0.3	0	0
pp65	3.6±0.5	3.0±0.2	1.7±0.2	1.0±0.2	0	0
gB	0	0	1.5±0.3	3.4±0.2	0.1±0.03	0

Примечание: * Количество клеток, содержащих вирусные белки, %

3.4. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ ЦМВ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТА

Для количественного определения белков ЦМВ в популяции зараженных клеток ТНР-1 пробы от инфицированных клеток отбирали через 4 часа, 1, 2, 3, 7 и 14 с.п.и. вирусом с инфекционной множественностью 5 БОЕ/кл. Содержание вирусных белков в клетках ТНР-1 определяли в клеточных лизатах методом иммуноблота. Результаты представлены на рисунке 15.

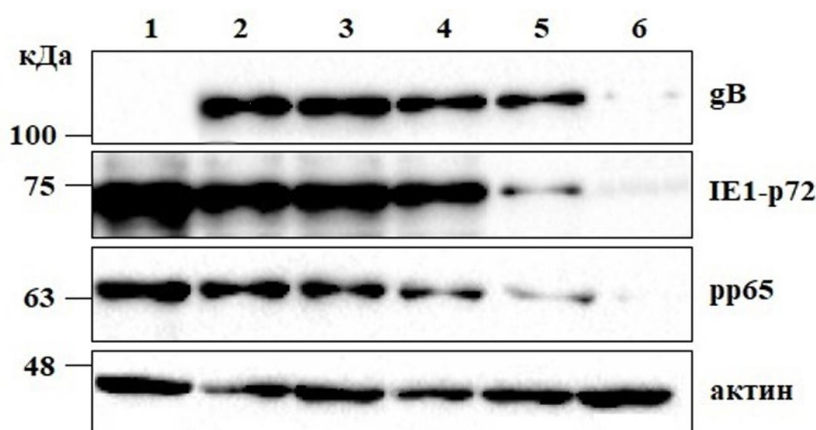


Рисунок 15. Сравнительный анализ содержания вирусных белков в ЦМВ-инфицированных клетках ТНР-1 в различные сроки после заражения. Дорожки: 1 - 4 часа после заражения, 2 - 1 сутки после заражения, 3 - 2 сутки после заражения, 4 - 3 сутки после заражения, 5 - 7 сутки после заражения, 6 – 14 сутки после заражения. Слева - молекулярные массы; справа - белки ЦМВ и актин.

Полученные данные показали, что уже через сутки после заражения в клетках ТНР-1 присутствовали сверхранние, ранние и поздние вирусные белки (рисунок 13, дорожка 2). Начиная с третьих суток, содержание белков ЦМВ постепенно уменьшалось, на 7 с.п.и. белки IE1-p72 и pp65 выявлялись слабо (рисунок 13, дорожка 5), на 14 с.п.и. вирусные белки не обнаруживались (рисунок 13, дорожка 6). Динамика выявления белков IE1-p72 и pp65 методом иммуноблота и иммуноцитохимического окрашивания в принципе совпадает, данные по позднему гликопротеину gB - различаются. Методом иммуноблота белок gB был выявлен на первые сутки инфекции (рисунок 13, дорожка 2), тогда как в реакции

иммуноцитохимического окрашивания в этот период не было выявлено клеток, содержащих вирусный белок (таблица 4). Окрашенные клетки были выявлены только на 2 с.п.и. Кроме того, методом иммуноблота максимальное содержание этого белка наблюдалось на 1 с.п.и., а максимальное количество gB-положительно окрашенных клеток - на 3 с.п.и. Отличия в детекции вирусных белков, по-видимому, связаны с различным материалом (лизаты или неразрушенные клетки), а также с различной чувствительностью методов детекции.

Таким образом, можно констатировать, что после проникновения ЦМВ в клетки ТНР-1 начинается каскадный синтез вирусных белков как регуляторных (IE1-p72), так и структурных (pp65 и gB). Однако через 7 с.п.и. сверхранний и ранний вирусные белки в клетках ТНР-1 обнаруживаются в небольших количествах и только при выявлении методом вестернблота, а через 14 с.п.и. все изученные белки ЦМВ не выявлялись при использовании обоих методов.

3.5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДНК ЦМВ В ПОПУЛЯЦИИ ТНР-1 И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСНУЮ ДНК

Отсутствие вирусных белков на поздних стадиях ЦМВ-инфекции в клетках ТНР-1 может свидетельствовать о том, что ЦМВ либо элиминирует, либо сохраняется в клетках, но переходит в транскрипционно неактивное состояние. В связи с этим были проведены опыты, направленные на обнаружение вирусной ДНК в культуре ТНР-1 на протяжении 14 суток после заражения. ДНК ЦМВ выявляли двумя методами - методом ПЦР в лизатах клеток и методом ДНК-ДНК гибридизации в клетках *in situ*. Методом гибридизации ДНК ЦМВ *in situ* было установлено, что через 24 часа после инфицирования $84 \pm 5\%$ клеток содержали метку, свидетельствующую о присутствии ДНК ЦМВ (рисунок 16).

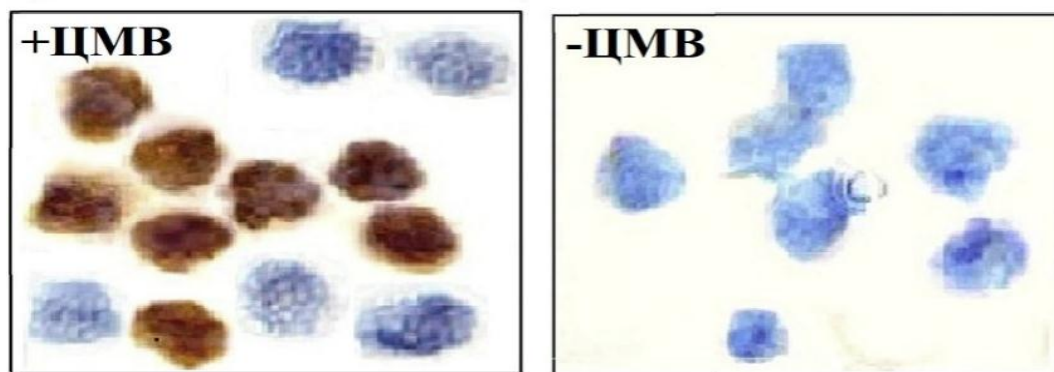


Рисунок 16. Обнаружение ДНК ЦМВ в клетках ТНР-1 через 24 часа после заражения методом ДНК-ДНК гибридизации *in situ*. Коричневая окраска – метка ДНК ЦМВ, синяя окраска – докраска гематоксилином. Увеличение 600х.

Данные по более поздним стадиям инфекции (5 и 7 с.п.и.) не представлены, так как клетки после процедур гибридизации откреплялись, и на препаратах их количество резко снижалось, что затрудняло количественный анализ меченых клеток в популяции *in situ* и статистическую обработку данных.

Результаты, полученные методом ПЦР в реальном времени, представлены на рисунке 17.



Рисунок 17. Количественная оценка уровней вирусной ДНК в динамике ЦМВИ в клетках ТНР-1 по данным ПЦР в реальном времени. По оси абсцисс – время после заражения, сут. По оси ординат – средние значения концентрации ДНК ЦМВ, количество копий/мл $\pm$ стандартная ошибка среднего трех независимых измерений, логарифмическая шкала.

Было показано, что концентрация ДНК ЦМВ на протяжении всего изученного срока оставалась на уровне 10^6 копий/мл. При пересчете на количество клеток оказалось, что к 14 с.п.и. относительное содержание вирусной ДНК на клетку практически не изменялось в динамике инфекции, составляя через 24 часа после заражения в среднем $15 \pm 6,4$ копий ДНК ЦМВ на клетку и через 14 с.п.и. – $18 \pm 5,6$ копий/кл ($p > 0,05$), когда вирусные белки уже не выявлялись.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после инфицирования ЦМВ вирусная ДНК длительно присутствует в клетках ТНР-1 (по крайней мере, в течение 14 с.п.и.), тогда как содержание вирусных белков постепенно снижается и к 14 с.п.и. не обнаруживается.

3.6. ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСНЫХ ГЕНОВ В ДИНАМИКЕ ЦМВИ

Экспрессия вирусных генов во время репликативного цикла ЦМВ – это упорядоченный каскад, начинающийся с активации сверххранних генов с последующей активацией ранних и поздних генов. Эта закономерность в порядке экспрессии генов была определена для продуктивной инфекции в чувствительных клетках – фибробластах человека; однако было не ясно, как вирусный транскриптом регулируется в других типах клеток, в том числе в опухолевых клетках ТНР-1.

Для ответа на этот вопрос клетки заражали ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/кл и пробы отбирали на 1, 7 и 14 с.п.и. Оценку экспрессии вирусного генома проводили по пяти генам, три из которых активны при литической ЦМВИ: *UL122* – сверххранний ген, кодирующий белок IE2-p86; *UL54* – ранний ген, кодирующий вирусную ДНК-полимеразу; *UL83* – ранний ген, кодирующий мажорный белок тегумента pp65. Определяли также мРНК двух генов, активность которых описана при латентной ЦМВИ: *UL138* и *UL82*. В качестве референсного гена был использован *GUS*, кодирующий бета-глюкуронидазу человека. Количественное определение мРНК проводили с помощью ПЦР в реальном времени с обратной

транскрипцией (ОТ-ПЦР). Было показано, что к 7 с.п.и. по сравнению 1 с.п.и. уровни мРНК *UL138* и *UL82* статистически значимо увеличиваются (в 6 раз и 8 раз соответственно) и поддерживаются на высоком уровне до 14 с.п.и. (рисунок 18).

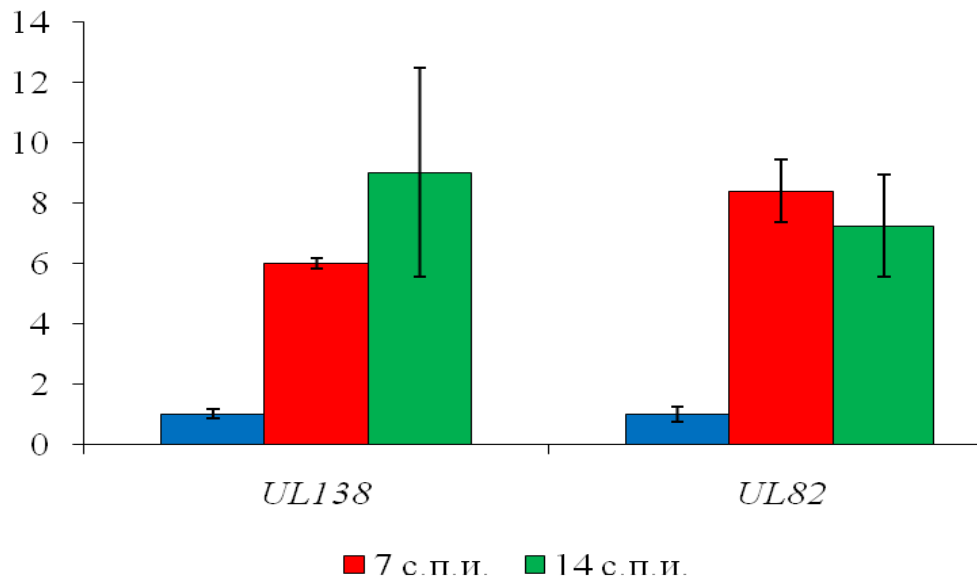


Рисунок 18. Относительное содержание мРНК латентных генов *UL138* и *UL82*, кодируемых ЦМВ, в клетках ТНР-1 в течение 14 с.п.и. По горизонтали – время после заражения, по вертикали – относительное содержание мРНК ЦМВ, кратные изменения по сравнению с уровнями мРНК через 1 с.п.и., которые приняты за 1.

Изучение уровней транскрипции регуляторного сверххранного гена *UL122* и ранних генов *UL54* и *UL83* в клетках ТНР-1 через 1, 7 и 14 с.п.и. ЦМВ показало (рисунок 19), что количества детектируемых мРНК генов *UL54* и *UL122* к 7 с.п.и. увеличивается приблизительно 3-5 раз, соответственно, по сравнению с первыми сутками после заражения. Экспрессия гена *UL83* также несколько увеличивалась к 7 с.п.и., но увеличение не достигало статистической значимости.

К 14 с.п.и. количество мРНК всех изученных вирусных генов резко снижалось: мРНК *UL122* - в 12 раз, становясь ниже уровня транскрипции на первых сутках ЦМВИ ($p < 0,05$); *UL54* - более чем в 2 раза; *UL83*- более чем в 8 раз по сравнению с 7 с.п.и. (рисунок 19).

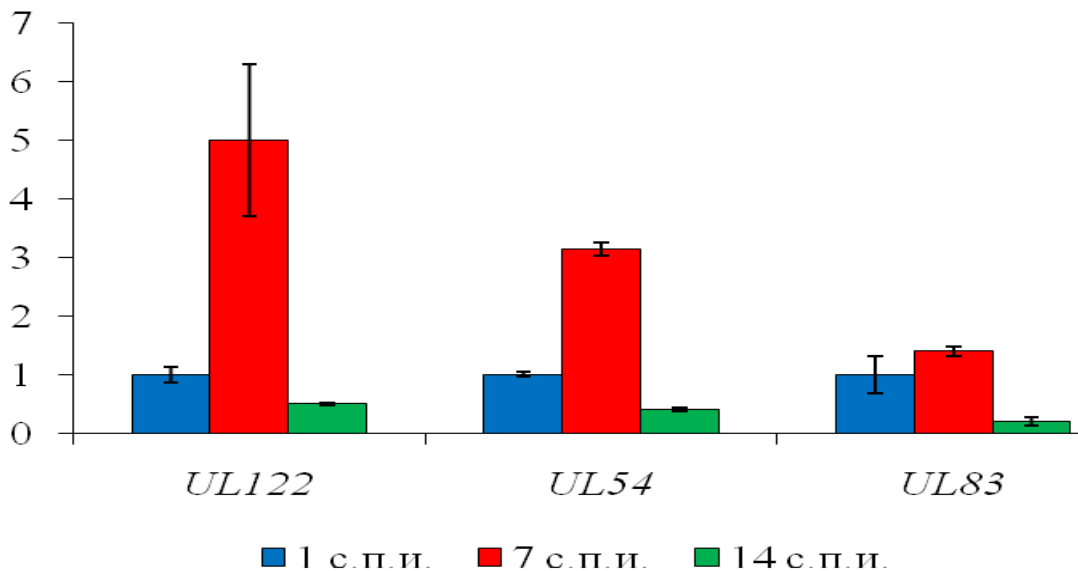


Рисунок 19. Относительное содержание мРНК сверххраненного гена *UL122* и ранних генов *UL54* и *UL83* в клетках THP-1 через 1, 7 и 14 с.п.и. инфицирования ЦМВ. По горизонтали – время после заражения, сутки; по вертикали - кратные изменения по сравнению с уровнями мРНК через 1 с.п.и., которые приняты за 1.

Количественный анализ мРНК 5 изученных генов ЦМВ показал, что изменения уровней транскрипции генов *UL138* и *UL82*, с одной стороны, и генов *UL122*, *UL54* и *UL83* – с другой, имели противоположную направленность: в динамике ЦМВИ в клетках THP-1 экспрессия «латентных» генов возрастала, тогда как «литических» генов – снижалась. Сопоставление относительно высокого уровня мРНК «литических» генов через 7 с.п.и. с низким содержанием вирусных белков, кодируемых этими генами (таблица 4; рисунок 15), указывает на abortивный характер ЦМВИ в клетках THP-1. Для проверки этого предположения была изучена инфекционная активность вируса, продуцируемого в клетках THP-1.

3.7. ОТСУТСТВИЕ ИНФЕКЦИОННО АКТИВНОГО ВИРУСА В КЛЕТКАХ THP-1, ЗАРАЖЕННЫХ ЦМВ

Для характеристики формы ЦМВ инфекции в клетках THP-1 в настоящей работе были проведены опыты по обнаружению вновь синтезированного

инфекционно активного вируса. Для этого использовали высокочувствительные к ЦМВ клетки ФЛЭЧ – фибробласты легкого эмбриона человека. В лунки с клетками ФЛЭЧ вносили культуральную жидкость от ЦМВ-инфицированных ТНР-1, отобранную на разных сроках после заражения (5, 7 и 14 с.п.и.). Белки ЦМВ в клетках ФЛЭЧ детектировали через 7 суток после внесения культуральных жидкостей с помощью смеси МКА к белкам IE1-p72 и pp65 ЦМВ. Опыты показали, что клетки ФЛЭЧ, содержащие белки ЦМВ, ни в одном случае не были обнаружены. Это означает, что культуральные жидкости от клеток ТНР-1 ни на одном из исследуемых сроков не содержали вируса, способного заразить клетки ФЛЭЧ. В качестве положительного контроля использовали культуральную жидкость от клеток ФЛЭЧ, отобранную через 7 с.п.и. этих клеток ЦМВ с ИМ 0,001 БОЕ/кл. Изучение клеток ФЛЭЧ показало присутствие инфицированных клеток, содержащих вирусные белки, причем к 7 суткам количество инфицированных клеток составляло около 100%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в клетках ТНР-1 не происходило образования инфекционно активного вируса. Эти данные подтверждают вывод о том, что инфекция ЦМВ в клетках моноцитарной лейкемии носит абортивный характер и к 14 суткам переходит в латентное состояние.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ДОКС НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ, В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛА ПОЛИАМИНОВ И МОЛЕКУЛЯРНОГО ПУТИ МТОР

4.1. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКС НА КЛЕТКИ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦМВ.

Вначале определяли влияние ДОКС на жизнеспособность неинфицированных клеток ТНР-1. Цитотоксичность оценивали по изменению метаболической активности клеток ТНР-1 с помощью МТТ-теста. В опытах были использованы концентрации ДОКС от 0,5 до 10 мкг/мл (рисунок 20).

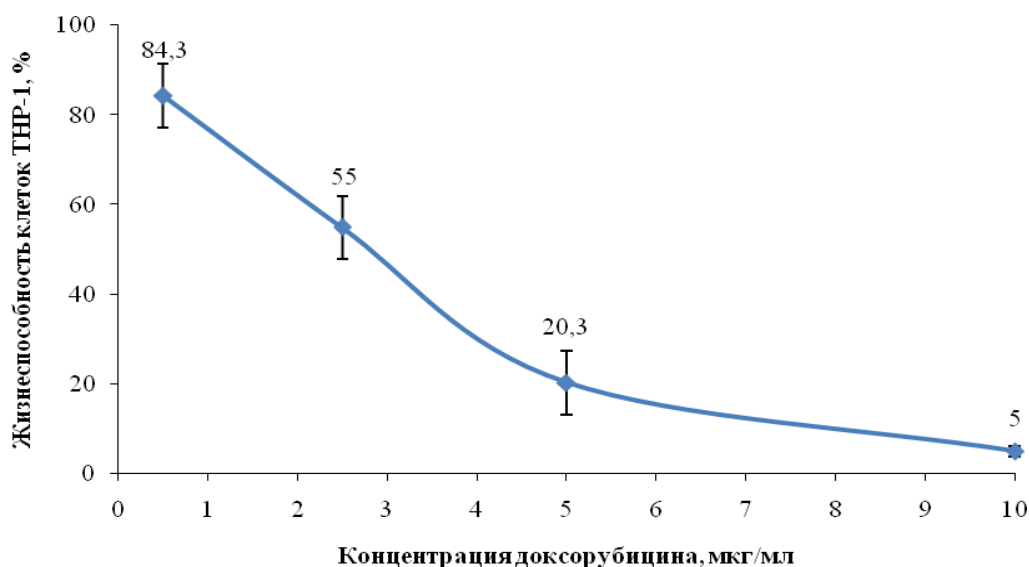


Рисунок 20. Негативное влияние ДОКС на жизнеспособность клеток ТНР-1.

Через 24 часа проводили анализ результатов МТТ. Было показано, что действие ДОКС носит дозозависимый характер. Концентрация, при которой наблюдалось снижение жизнеспособности клеток на 50% (CD_{50}) составляла 3,4 мкг/мл, при увеличении концентрации гибель клеток возрастала. В дальнейших опытах мы использовали концентрацию ДОКС равную 5 мкг/мл, при которой наблюдалось снижение жизнеспособности клеток ТНР-1 на 80%. Такая

концентрация была выбрана на основании многочисленных опытов с целью более четкого выявления различий в действии ДОКС на неинфицированные и ЦМВ инфицированные клетки.

Затем было изучено действие ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1. Влияние ЦМВ на цитотоксическое действие ДОКС изучали при внесении ДОКС в концентрации 5 мкг/мл через 4 часа, 7 и 14 с.п.и. в инфицированные и неинфицированные клетки. Результаты оценивали после инкубации с ДОКС в течение 24 часов (рисунок 21).

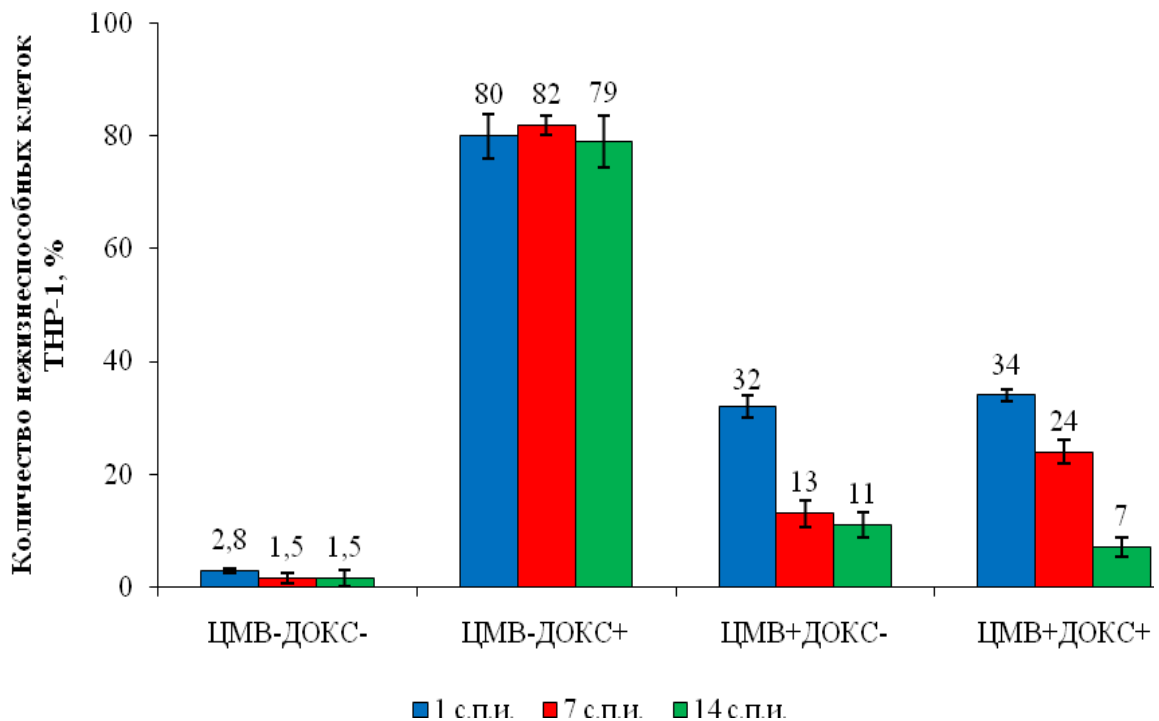


Рисунок 21. Снижение цитотоксического действия ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 по сравнению с неинфицированными клетками через 1, 7 и 14 сутки после инфицирования. По горизонтали: ЦМВ-ДОКС- – неинфицированные клетки, не обработанные ДОКС; ЦМВ-ДОКС+ – неинфицированные клетки, обработанные ДОКС; ЦМВ+ДОКС- – инфицированные клетки, не обработанные ДОКС; ЦМВ+ДОКС+ – инфицированные клетки, обработанные ДОКС. с.п.и. - сутки после инфицирования. По вертикали – количество нежизнеспособных клеток, в %.

Внесение ДОКС в инфицированную культуру через 4 часа после заражения и последующая инкубация в течение 24 часов (срок обозначили как 1 с.п.и.) не привели к изменению количества нежизнеспособных (погибших) клеток по сравнению с инфицированной культурой, не обработанной ДОКС: $32 \pm 1,9$ % и $34 \pm 1,1$ %, соответственно ($p > 0,05$).

Изучено влияние ДОКС на клетки ТНР-1, находящиеся на поздних стадиях инфекции. Подсчет жизнеспособных клеток через 7 и 14 с.п.и. показал, что в культуре инфицированных клеток ТНР-1, обработанных ДОКС, на 7 с.п.и. доля нежизнеспособных клеток составляла $24 \pm 2,2$ %, на 14 с.п.и. – $7 \pm 1,6$ %, тогда как в неинфицированных клетках – $82 \pm 1,7$ % и $79 \pm 4,6$ %, соответственно.

Полученные результаты показали, что после заражения ЦМВ клетки ТНР-1 приобретают устойчивость к действию антибиотика ДОКС, по сравнению с неинфицированной культурой. Резистентность к ДОКС проявлялась на ранних сроках инфекции - 4 часа после заражения, поздних – 7 с.п.и. и сохранялась на 14 с.п.и.

4.2. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ, ИСПОЛЬЗОВАВШИХСЯ В РАБОТЕ, НА КЛЕТКИ ТНР-1

Для изучения клеточных факторов, которые могут влиять на устойчивость опухолевых клеток к антибиотику, были проведены опыты с использованием ингибиторного анализа. Вначале необходимо было оценить цитотоксичность применяемых ингибиторов в отношении клеток ТНР-1.

Для оценки цитотоксичности ингибиторов метаболизма полиаминов были изучены MDL72.527 в концентрациях от 2 до 400 мкМ/мл (рисунок 22) и DFMO - от 4 до 37,5 мкМ/мл (рисунок 23).

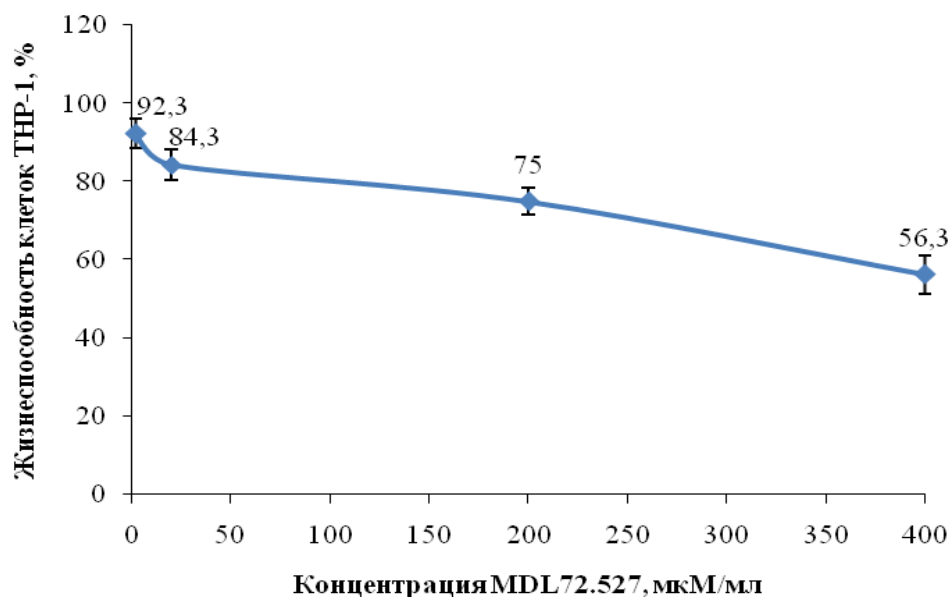


Рисунок 22. Дозозависимое действие ингибитора цикла полиаминов MDL72.527 на жизнеспособность клеток THP-1.

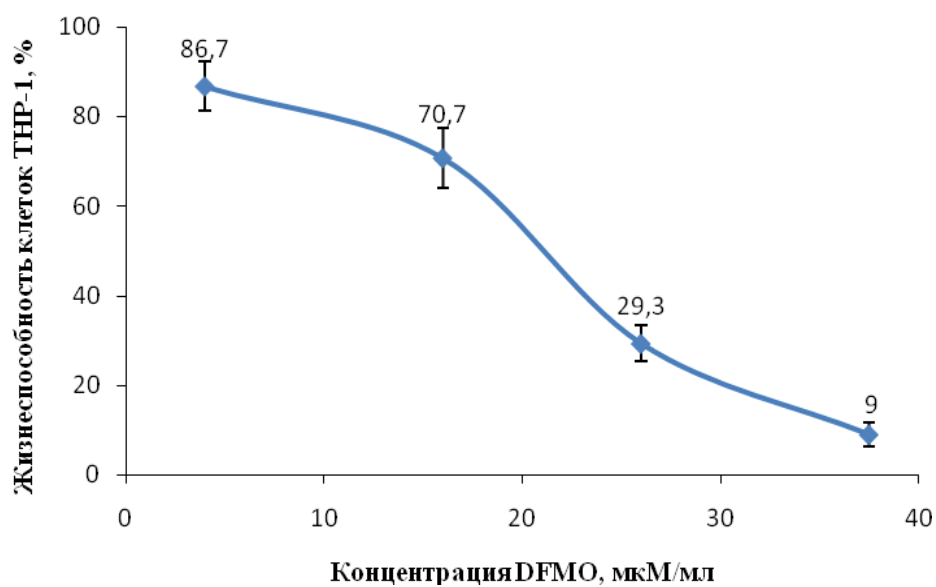


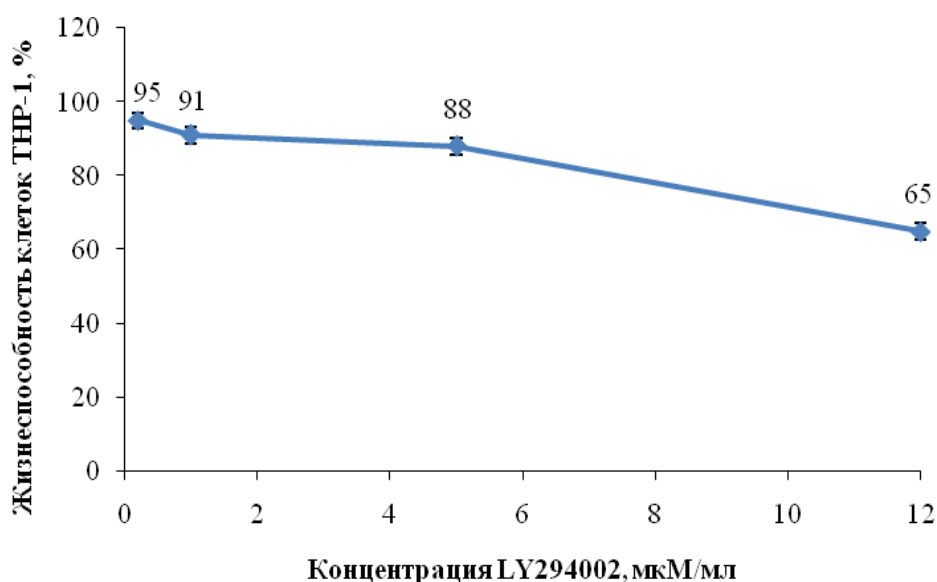
Рисунок 23. Дозозависимое действие ингибитора цикла полиаминов DFMO на жизнеспособность клеток THP-1.

Методом экстраполяции определяли концентрации, вызывающие гибель 50% и 20% клеток THP-1. Данные приведены в таблице 5.

Таблица 5. Цитотоксическое действие (ЦД) ингибиторов на клетки ТНР-1.

ЦД	Соединения							
	концентрации, мкг/мл					концентрации, мкМ/мл		
	ДОКС	ГАНЦ	ДВА11	РАПА	Торин2	LY 294002	MDL 72.527	DFMO
ЦД ₅₀	3,4	61	471	15,3	0,13	19	400	21
ЦД ₂₀	0,3	25	117	8,5	0,05	6,5	20	9

Определяли цитотоксичность ингибиторов молекулярного пути PI3K/AKT/mTOR. Для оценки действия на жизнеспособность клеток ТНР-1 ингибитора PI3K - LY294002 соединение было изучено в концентрациях от 0,2 до 5 мкМ/мл (рисунок 24).

**Рисунок 24.** Дозозависимое действие ингибитора PI3K – LY294002 на жизнеспособность клеток ТНР-1.

Рассчитанные концентрации, вызывающие гибель 50% и 20% клеток ТНР-1 приведены в таблице 5.

Для оценки цитотоксического действия ингибиторов mTOR рапамицина (РАПА) и Торино2 были изучены соединения в концентрациях от 8 до 22 мкг/мл (рисунок 25) и от 0,005 до 0,1 мкг/мл (рисунок 26), соответственно.

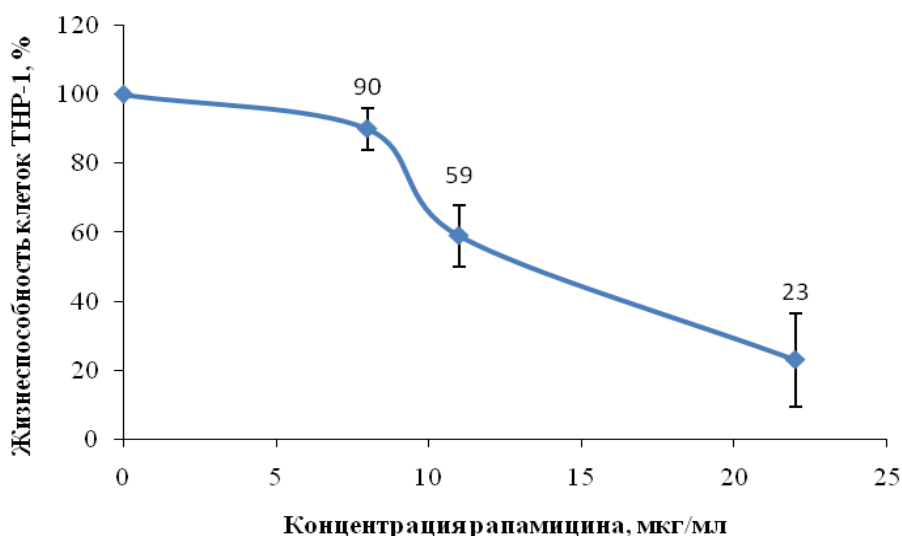


Рисунок 25. Дозозависимое действие РАПА на жизнеспособность клеток ТНР-1.

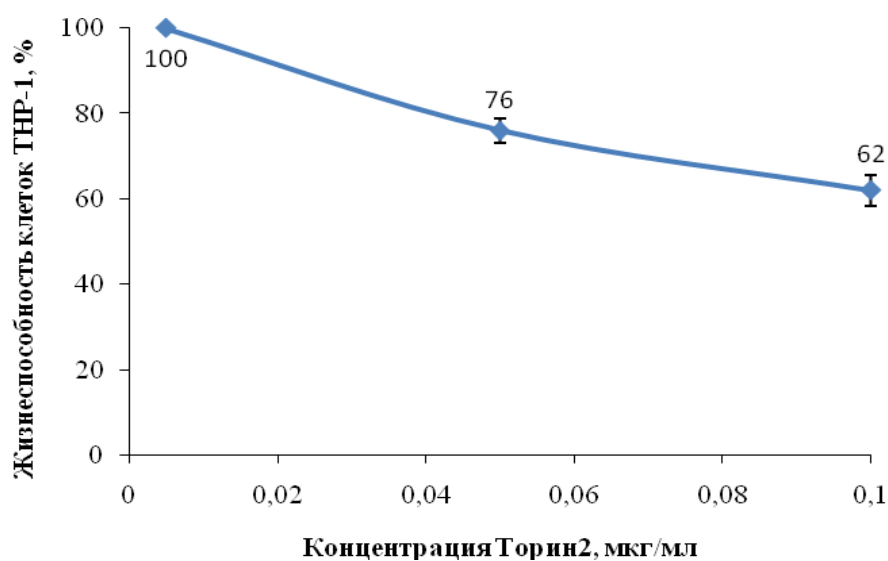


Рисунок 26. Дозозависимое действие Торино2 на жизнеспособность клеток ТНР-1.

Концентрации соединений, ингибирующие токсическое действие РАПА и Тормина2 на клетки ТНР-1, приведены в таблице 5.

Далее была проведена оценка цитотоксического действия на клетки ТНР-1 двух соединений, подавляющих ЦМВИ: препарата, используемого при лечении ЦМВИ – ганцикловира (ГАНЦ) в концентрациях от 0,1 до 30 мкг/мл (рисунок 27), а также нового соединения из серии АТ-специфичных флуоресцентных димерных бисбензимидазолов - DBA11 в концентрациях от 5 до 1000 мкг/мл (рисунок 28).

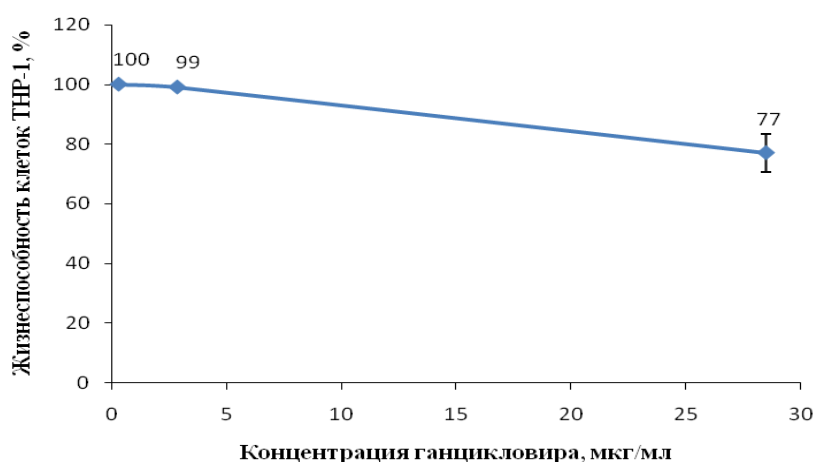


Рисунок 27. Цитотоксическое действие ГАНЦ на клетки ТНР-1.

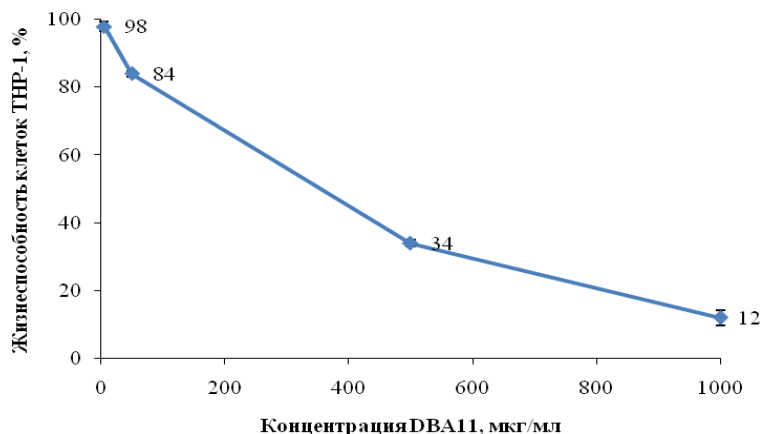


Рисунок 28. Цитотоксическое действие DBA11 на клетки ТНР-1.

О цитотоксическом действии (ЦД) каждого из ингибиторов судили по концентрации, вызывающей гибель 20% (ЦД₂₀) и 50% (ЦД₅₀) клеток через 1 сутки после внесения в культуру ТНР-1. Данные, полученные по графикам методом экстраполяции для каждого из исследованных соединений представлены в таблице 5.

В дальнейших опытах ингибиторы использовали в концентрациях, вызывающих гибель 20% клеток ТНР-1, так как более высокие концентрации (ЦД₅₀) ингибиторов могли снизить или нивелировать статистическую значимость эффектов ингибиторов на фоне цитотоксического действия вируса.

4.3. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКС НА КЛЕТКИ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦМВ В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ МЕТАБОЛИЗМА ПОЛИАМИНОВ MDL72.527 И DFMO

Через 4 часа после заражения ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/кл вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с MDL72.527 в концентрации 20 мкМ/мл, либо с DFMO в концентрации 9 мкМ/мл и инкубировали 24 часа. Показано, что оба ингибитора подавляли жизнеспособность неинфицированных клеток ТНР-1 в среднем на $24,3 \pm 4\%$ (MDL72.527) и $15 \pm 2,2\%$ (DFMO). При совместном действии ДОКС и MDL72.527 не было статистически значимого снижения жизнеспособности клеток ТНР-1, в сравнении с ДОКС обработанной культурой, тогда как при совместном действии ДОКС и DFMO наблюдалось уменьшение количества погибших клеток до $50 \pm 5\%$ (против $80 \pm 3,9\%$, соответственно) ($p < 0,05$).

Под действием ингибиторов на ЦМВ-инфицированные ТНР-1 без ДОКС количество нежизнеспособных клеток составило $19,3 \pm 1,2\%$ и $27 \pm 3,8\%$ (MDL72.527 и DFMO, соответственно). Значительные изменения наблюдались при действии MDL72.527 на ЦМВ инфицированные и обработанные ДОКС

клетки ТНР-1: количество нежизнеспособных клеток увеличилось с $34 \pm 1,1\%$ до $92,3 \pm 4,2\%$ ($p < 0,05$) (рисунок 29).

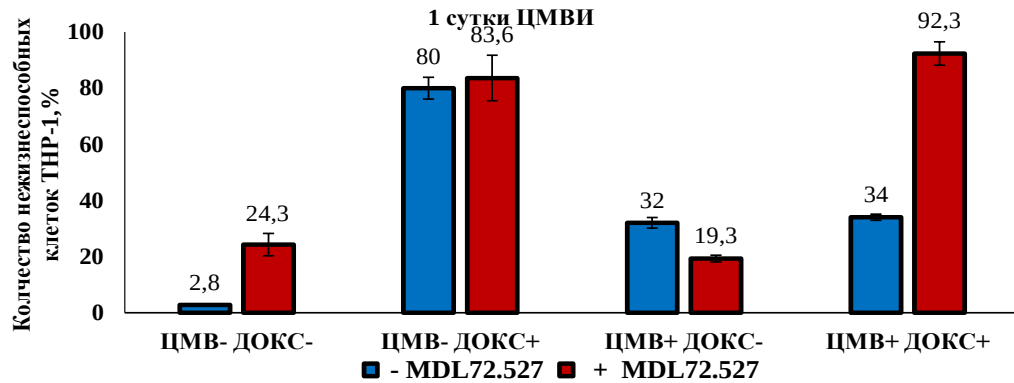


Рисунок 29. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1 через 1 с.п.и. ЦМВ в присутствии ингибитора катаболизма полиаминов MDL72.527. Условия опытов (заражение ЦМВ и обработка ДОКС) обозначены как на рис. 21.

При совместном действии ДОКС и DFMO на ЦМВ инфицированные клетки количество нежизнеспособных клеток ТНР-1 статистически значимо не изменилось (рисунок 30)

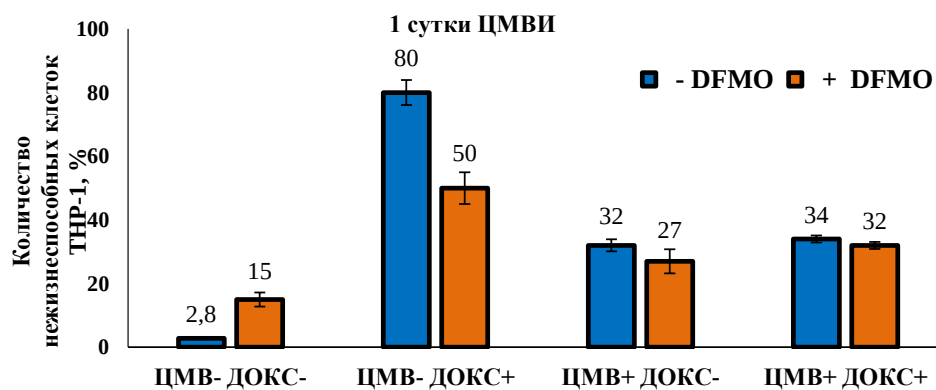


Рисунок 30. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1 через 1 с.п.и. ЦМВ в присутствии ингибитора метаболизма полиаминов DFMO. Условия опытов (заражение ЦМВ и обработка ДОКС) обозначены как на рис. 21.

Эти данные указывают на то, что MDL72.527, ингибитор катаболизма полиаминов, восстанавливал чувствительность клеток ТНР-1 к ДОКС уже в первые сутки ЦМВИ. Напротив, DFMO, ингибитор орнитиндекарбоксилазы (ODC), снижающий уровни внутриклеточных полиаминов, не оказывал статистически значимого влияния на жизнеспособность ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1, обработанных ДОКС.

Так как мы показали (рисунок 21), что ЦМВИ снижает эффективность действия ДОКС не только на активно инфицированные клетки ТНР-1 (1 с.п.и.), но также и на латентно инфицированные клетки (7 и 14 с.п.и.), представляло интерес изучить, происходит ли восстановление чувствительности к ДОКС клеток ТНР-1 при совместном действии с MDL72.527 на 7 и 14 с.п.и.

Цитотоксическое действие MDL72.527 на ЦМВ инфицированные клетки без обработки ДОКС на 7 и 14 с.п.и. оказалось значительно выше ($80\pm6,1\%$ и $88\pm2,4\%$, соответственно), чем на первые сутки ($19,3\pm1,2\%$) ($p<0,05$). Совместное действие MDL72.527 и ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки вызывало гибель практически всех клеток ТНР-1: $99\pm0,5\%$ на 7 с.п.и. (рисунок 31) и $96\pm1,4\%$ на 14 с.п.и. (рисунок 32).

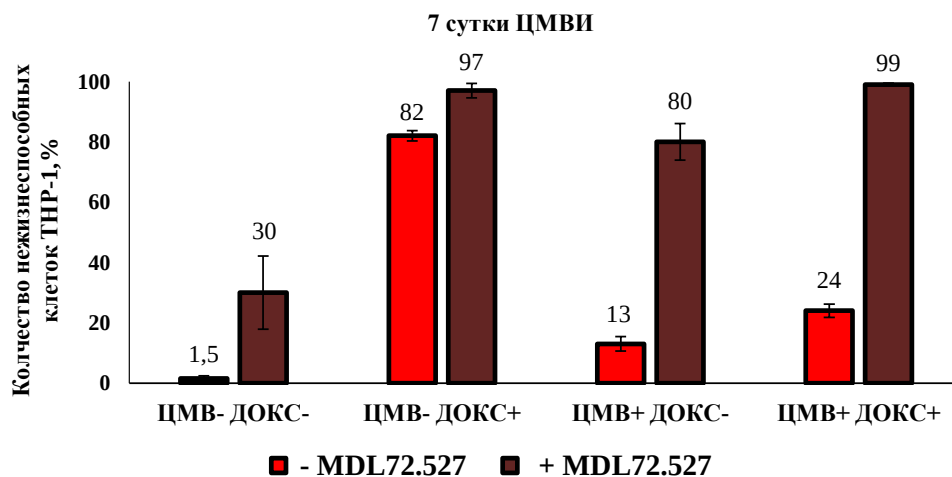


Рисунок 31. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1 в присутствии MDL72.527 на 7 с.п.и. ЦМВ. Условия опытов (заражение ЦМВ и обработка ДОКС) обозначены как на рис. 21.

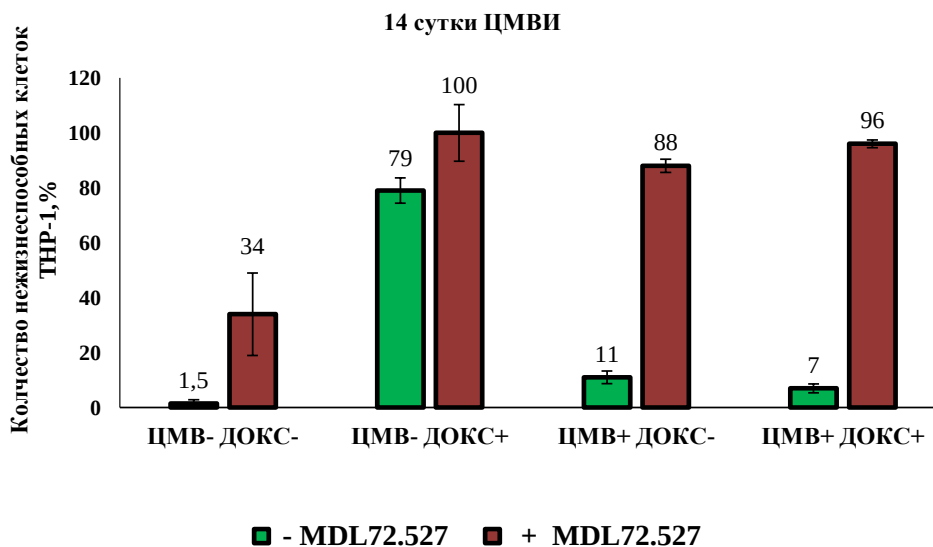


Рисунок 32. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки THP-1 в присутствии MDL72.527 14 с.п.и. ЦМВ. Условия опытов (заражение ЦМВ и обработка ДОКС) обозначены как на рис. 21.

Таким образом, латентно инфицированные опухолевые клетки оказались более чувствительными к действию MDL72.527, чем активно инфицированные клетки. Важно отметить, что восстановление чувствительности латентных клеток к действию ДОКС в присутствии ингибитора происходило даже более эффективно, чем при действии на активно инфицированные клетки. Так, количество погибших клеток через 1 с.п.и. увеличилось 2,7 раз (с 34% до 92,3%), тогда как через 14 с.п.и. – в 13,7 раз (с 7% до 96%).

4.4. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКС НА КЛЕТКИ THP-1, ИНФИЦИРОВАННЫЕ ЦМВ, В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ MTOR – РАПАМИЦИНА И ТОРИНА2, И ИНГИБИТОРА PI3K – LY294002

Для выяснения влияния ингибиторов на действие ДОКС в культуру вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с рапамицином в концентрации 8,5 мкг/мл, либо с Торином2 в концентрации 0,05 мкг/мл через 1, 7 и 14 с.п.и.

ЦМВ и инкубировали 24 часа. Подсчет количества жизнеспособных клеток методом МТТ показал, что действие обоих ингибиторов не влияло на низкую жизнеспособность неинфицированных клеток ТНР-1 под действием ДОКС в первые сутки ($p>0,05$): при совместном действии РАПА с ДОКС гибель клеток составила $86,3\pm6,2\%$, при совместном действии с Торин2 - $81,4\pm7,3\%$ по сравнению с 80% погибших клеток под действием ДОКС без ингибиторов (рисунок. 33).

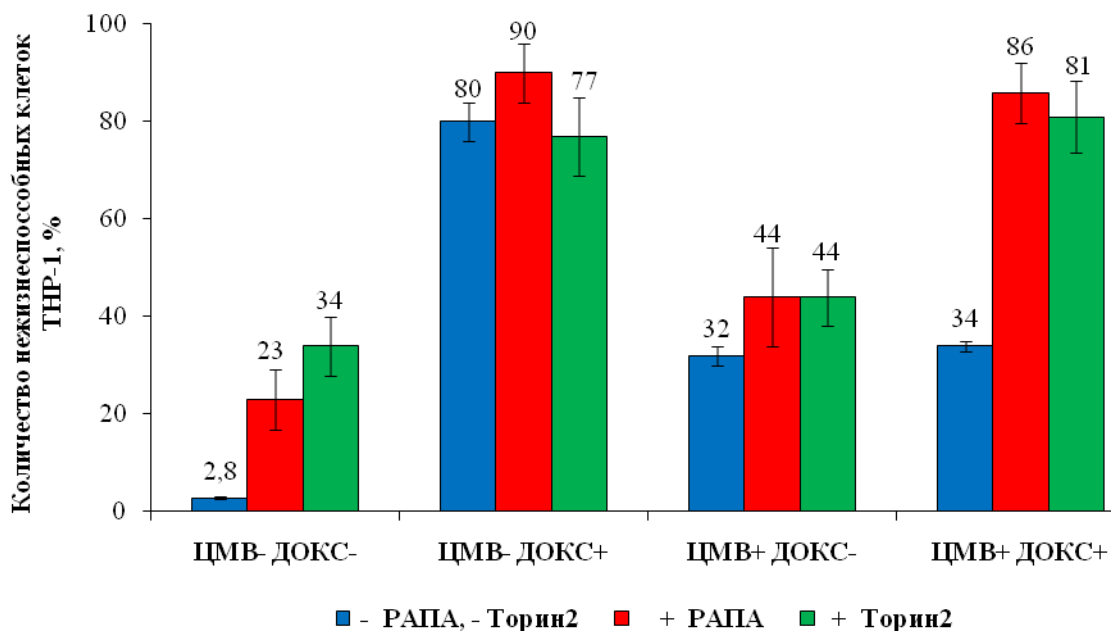


Рисунок 33. Цитотоксическое действие ДОКС и ингибиторов mTOR – рапамицина и Торина2 на неинфицированные клетки ТНР-1 и инфицированные клетки через 1 с.п.и. ЦМВ. Обозначения как на рисунке 21.

Важный результат получен при изучении действия ингибиторов на ЦМВ инфицированные клетки, гибель которых под действием ДОКС составляла 34%. При добавлении в культуру обоих ингибиторов жизнеспособность опухолевых клеток резко снижалась и составляла не более 4-9% (рисунок 33). Таким образом, ингибиторы mTOR мало влияли на высокое цитотоксическое действие ДОКС на незараженные клетки ТНР-1, но значительно усиливали действие ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки.

Результаты, полученные при воздействии ингибиторов mTOR на 7 и 14 с.п.и. ЦМВ, принципиально не отличались от тех, которые были получены через 1 с.п.и. Данные показали, что совместное действие ДОКС и ингибиторов mTOR на ЦМВ инфицированные клетки приводит к гибели $90\pm 6\%$ (РАПА) и $72\pm 2,4\%$ (Торин2) на 7 с.п.и. по сравнению с 24% без ингибиторов (рисунок 34).

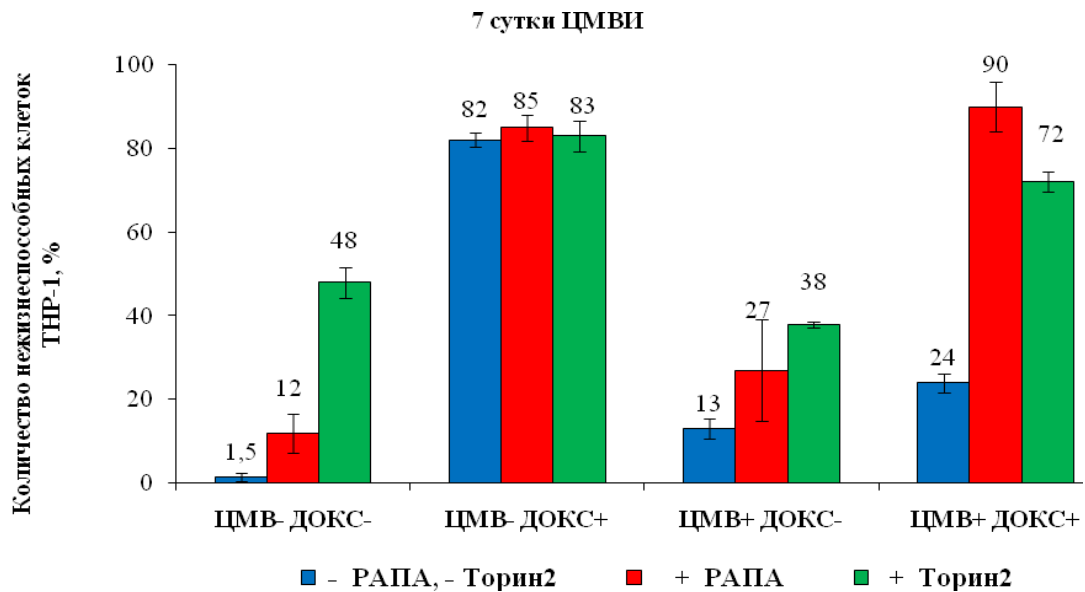


Рисунок 34. Цитотоксическое действие ДОКС и ингибиторов mTOR: рапамицина и Торинона2 на клетки ТНР-1 через 7 с.п.и. ЦМВ. Обозначения как на рисунке 21.

Следует отметить, что Торин2 проявил более высокую цитотоксичность по сравнению с РАПА: гибель интактных клеток ТНР-1 составила 48% против 12% ($p < 0,05$).

На 14 с.п.и. ЦМВ внесение РАПА не приводит к статистически значимому изменению количества погибших клеток, по сравнению с инфицированной, но не обработанной РАПА культурой ($p > 0,05$). Значительное снижение жизнеспособности ЦМВ инфицированных клеток ($p < 0,05$) наблюдается при совместном воздействии ДОКС с РАПА или Торином2, при этом доли погибших клеток составляют $64\pm 10,8\%$ и $79\pm 8,4\%$ соответственно по сравнению с 7% погибших клеток в инфицированной популяции без ингибиторов (рисунок 35).

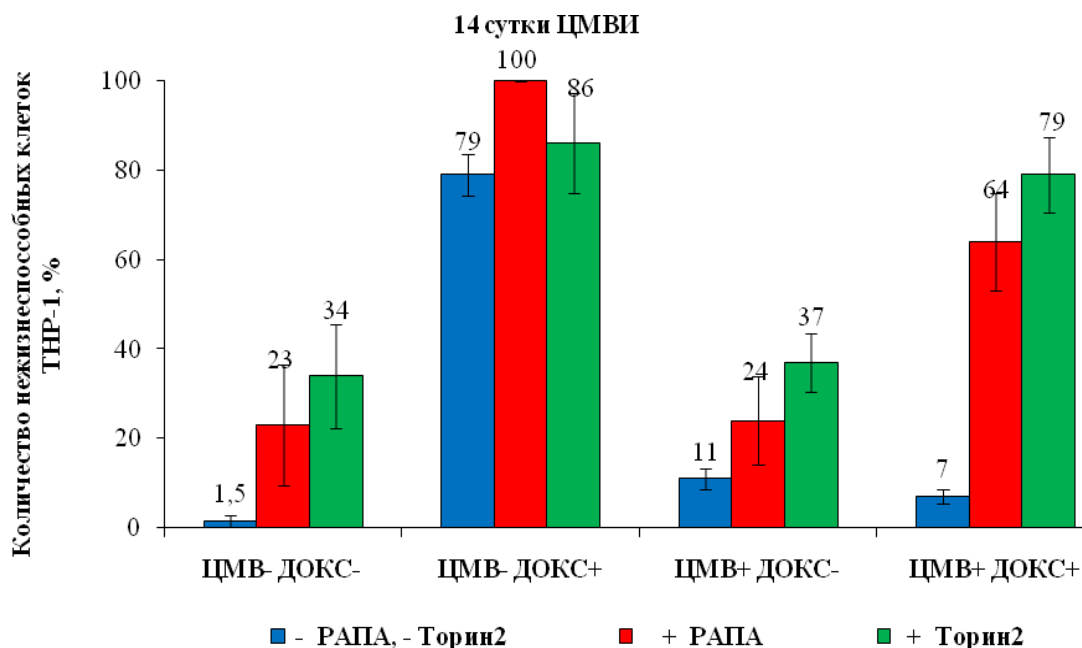


Рисунок 35. Цитотоксическое действие ДОКС и ингибиторов mTOR рапамицина и Торина2 на клетки ТНР-1 через 14 с.п.и. ЦМВ. Обозначения как на рисунке 21.

Результаты с ингибиторами mTOR показали, что РАПА оказывает незначительное цитотоксическое действие на клетки ТНР-1 на разных сроках ЦМВИ (1, 7 и 14 с.п.и.), но при совместном действии с ДОКС приводит к восстановлению чувствительности ЦМВ инфицированных клеток к действию антибиотика. Преодоление резистентности к ДОКС ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1 показано также на разных сроках после заражения при совместном действии антибиотика с ингибитором mTOR Торин2. Более сильное цитотоксическое действие Торина2, возможно, объясняется тем, что это соединение ингибирует не только комплекс mTORC1, как это установлено для РАПА, но также и комплекс mTORC2 в молекулярном пути PI3K/Akt/mTOR, который согласно имеющимся данным, способствует выживанию клеток.

Так как PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа) является важным компонентом сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, а ЦМВ повышает активность PI3K в чувствительных фибробластах [252], представляло интерес изучить влияние этой киназы на резистентность опухолевых клеток ТНР-1 к ДОКС. В

качестве молекулярного инструмента был использован ингибитор PI3K - LY294002.

После заражения ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/кл в культуру вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с LY294002 в концентрации 11 мкМ/мл (IC_{20}) и инкубировали 24 часа. Ингибитор PI3K - LY294002 вызывал гибель $15 \pm 2,6\%$ ЦМВ инфицированных клеток, что значимо не отличалось от действия на неинфицированные клетки: количество погибших клеток составило $22 \pm 1,7\%$ ($p > 0,05$). Совместное действие LY294002 с ДОКС на неинфицированные клетки ТНР-1 не показало статистически значимого изменения в жизнеспособности по отношению к неинфицированным клеткам, обработанным антибиотиком ($90 \pm 3,9\%$ и $80 \pm 3,9\%$, соответственно). Однако при совместном действии LY294002 и ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки увеличивалось количество погибших клеток с $34 \pm 1,1\%$ до $90 \pm 5,5\%$ (рисунок 36).

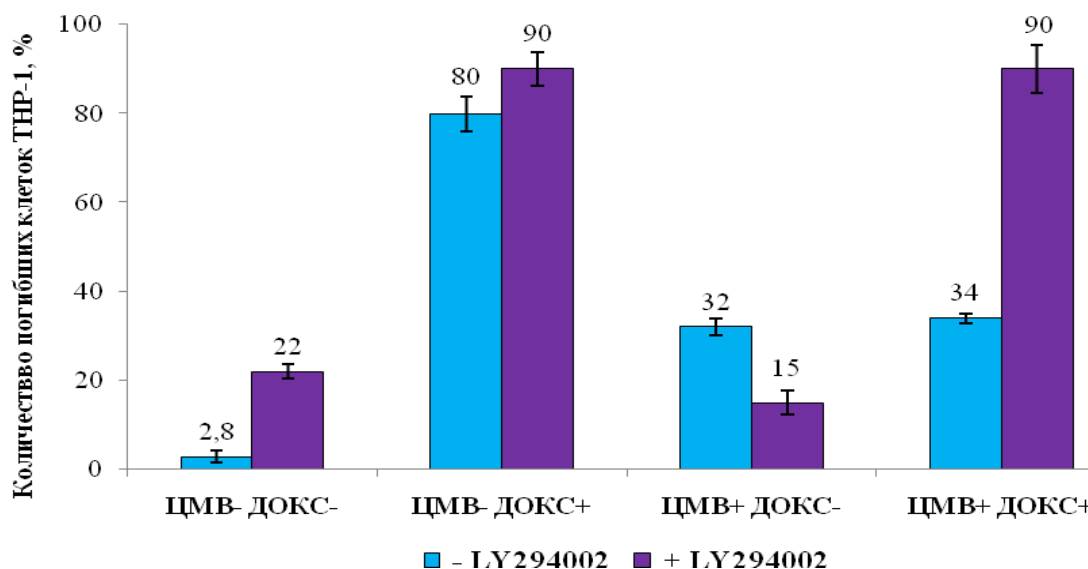


Рисунок 36. Цитотоксическое действие ДОКС в присутствии ингибитора PI3K - LY294002 на клетки ТНР-1 через 1 с.п.и. ЦМВ. Обозначения как на рисунке 21.

На 7 с.п.и. ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/кл в культуру вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с LY294002 в концентрации 11 мкМ/мл и инкубировали 24 часа.

Ингибитор PI3K LY294002 вызывал гибель $91\pm1\%$ ЦМВ инфицированных клеток, что значительно больше, чем действие на неинфицированные клетки: количество нежизнеспособных клеток составило $30\pm2,2\%$ ($p>0,05$). Совместное действие LY294002 с ДОКС на неинфицированные клетки THP-1 не показало статистически значимого изменения в жизнеспособности по отношению к неинфицированным клеткам, обработанным антибиотиком ($94\pm3,5\%$ и $80\pm3,9\%$, соответственно), $p>0,05$. Однако при совместном действии LY294002 и ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки увеличивалось количество погибших клеток с $13\pm2,4\%$ до $95\pm2,1\%$ (рисунок 37).

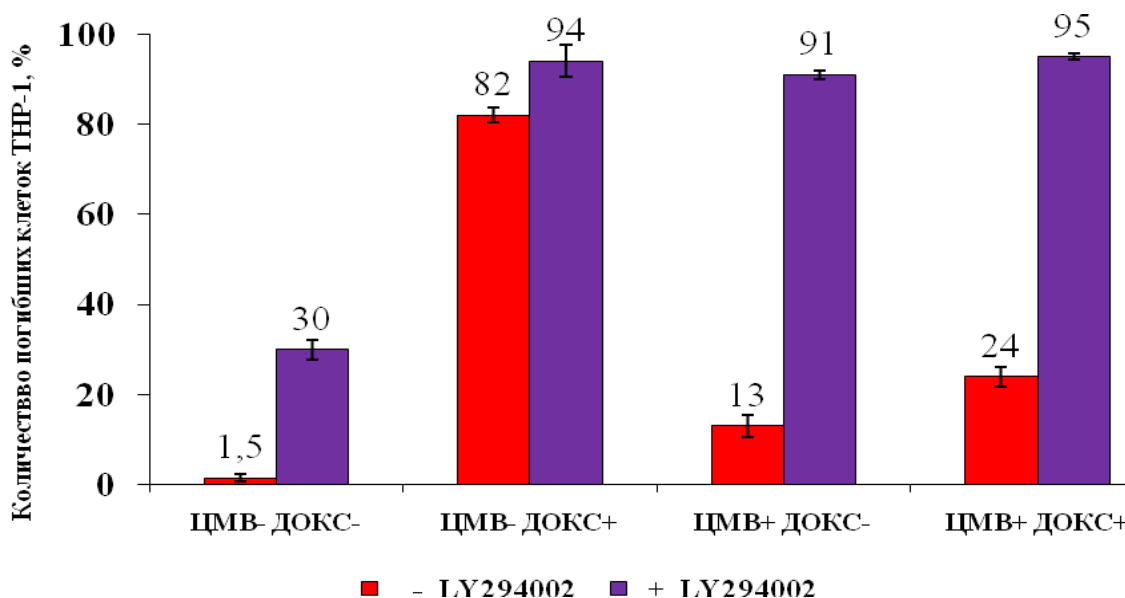


Рисунок 37. Цитотоксическое действие ДОКС в присутствии ингибитора PI3K - LY294002 на клетки THP-1, инфицированные ЦМВ, через 7 с.п.и. Обозначения как на рисунке 21.

Таким образом, показано, что совместное действие ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) - LY294002 и ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки приводит к статистически значимому увеличению чувствительности к антибиотику - в 4 раза (95% против 24% , $p<0,05$).

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ЦМВ ИНФЕКЦИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ТНР-1 К ДОКС

5.1 ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДОКС В КЛЕТКАХ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ В ПРИСУТСТВИИ ГАНЦИКЛОВИРА

ДНК-полимераза, необходимая для прохождения жизненного цикла ЦМВ при литической инфекции, играет роль мишени для использующихся сейчас противовирусных препаратов. Ганцикловир - нуклеозид (аналог гуанина), близкий по химической структуре к ацикловиру, используется при лечении ЦМВИ. Представляло интерес изучить, восстановит ли ганцикловир чувствительность инфицированных клеток ТНР-1 к действию ДОКС.

Через 4 часа, 7 и 14 с.п.и. ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/кл вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с ганцикловиром (ГАНЦ) в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали 24 часа (рисунок 38).

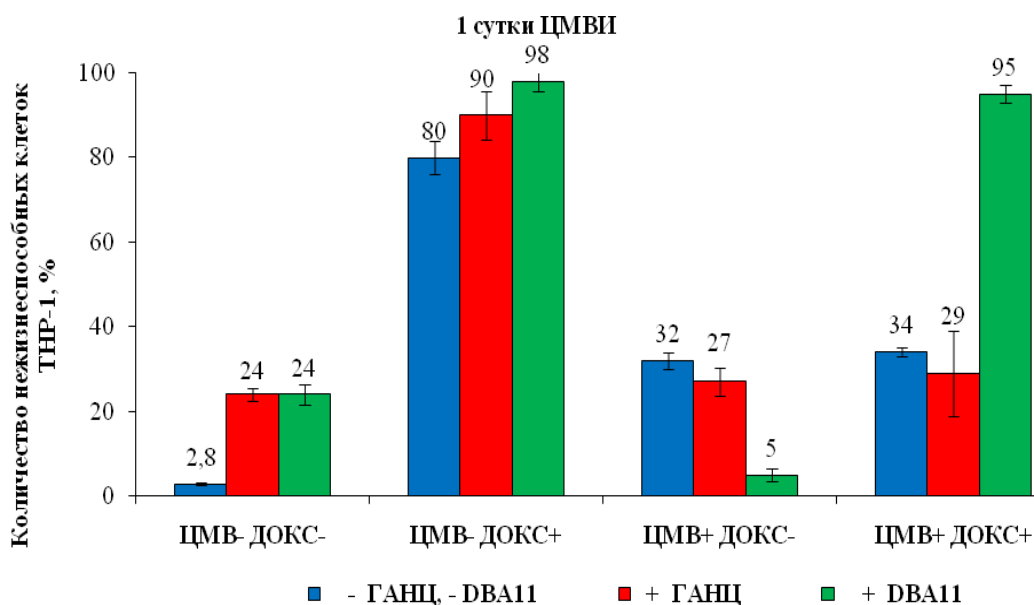


Рисунок 38. Цитотоксическое действие ДОКС, ГАНЦ и DBA11 на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 через 1 с.п.и. Обозначения как на рисунке 21.

В использованной концентрации ГАНЦ вызывал гибель $20 \pm 3,4\%$ инфицированных и $22 \pm 1,5\%$ не инфицированных клеток. При совместном добавлении к ТНР-1 ДОКС и ГАНЦ через 4 часа после заражения было установлено, что в присутствии ГАНЦ в инфицированной популяции ДОКС вызывает гибель $29 \pm 10,1\%$ клеток, в то время как в неинфицированной (контрольной) – $90 \pm 5,8\%$.

Через 7 и 14 с.п.и. ГАНЦ совместно с ДОКС вызывал гибель $37 \pm 14,9\%$ и $20 \pm 7,4\%$ клеток соответственно, тогда как совместное действие ГАНЦ и ДОКС на неинфицированные клетки ТНР-1 приводило к гибели $83 \pm 3,5\%$ и $80 \pm 11,9\%$ соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что при ингибировании синтеза вирусной ДНК сохраняется устойчивость ТНР-1 к ДОКС. Таким образом, установлено, что присутствие в клетках репликативно-активного ЦМВ не требуется для установления резистентности инфицированных клеток. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что поздние белки ЦМВ, которые синтезируются после репликации вирусного генома, повидимому, не влияют на установление резистентности клеток ТНР-1 к ДОКС (рисунок 39).

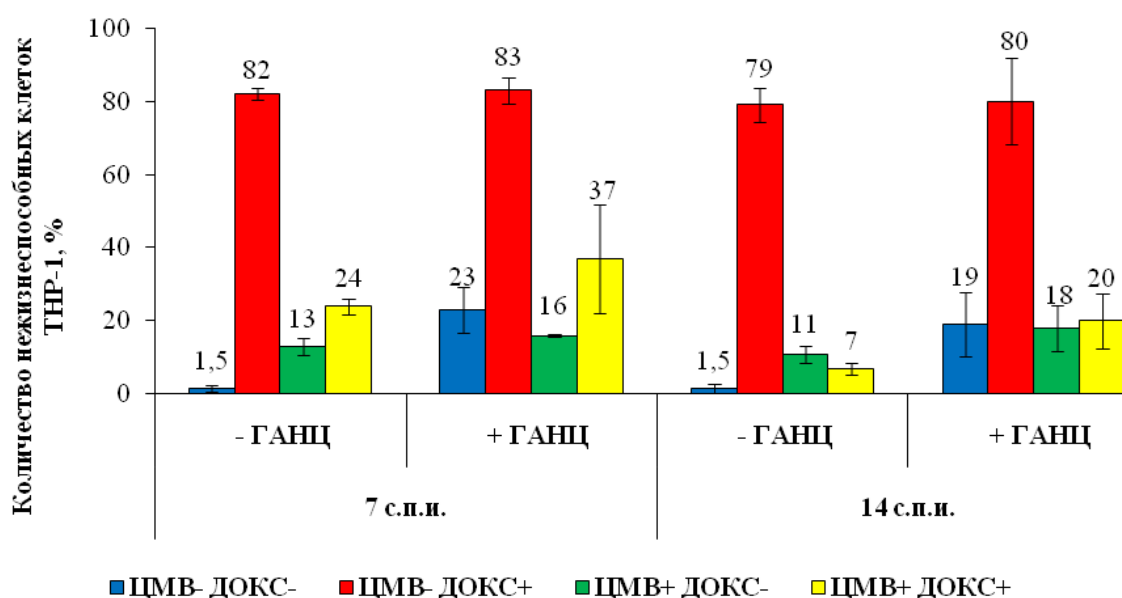


Рисунок 39. Цитотоксическое действие ДОКС, ГАНЦ на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 через 7 и 14 с.п.и. Обозначения как на рисунке 21.

5.2 ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДОКС В КЛЕТКАХ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ В ПРИСУТСТВИИ DBA11

Представляло интерес изучить, окажет ли влияние на чувствительность ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1 к ДОКС новое соединение - DBA11, синтезированное в группе А.Л. Жузе в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. DBA11 – димерный флюоресцирующий бисбензимидазол, который специфически связывается с АТ-парами в узкой бороздке ДНК [158].

Мы показали, что данное соединение проявляет противовирусную активность при заражении чувствительных к ЦМВ фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ. Цитотоксические свойства DBA11 оказались низкими – IC_{50} составляла 1696 мкг/мл, ингибирующая доза при добавлении DBA11 в культуру ФЛЭЧ через 1 час после заражения составила 30 мкг/мл. Таким образом, моделирование терапевтической активности *in vitro* показало, что изученное соединение умеренно, но значимо подавляет ЦМВИ в высоко чувствительных клетках, химиотерапевтический индекс был равен 56,5 [11].

Для анализа действия DBA11 на низко чувствительные к ЦМВ опухолевые клетки соединение вносили в концентрации 117 мкг/мл совместно с ДОКС в концентрации 5 мкг/мл в инфицированные и неинфицированные клетки ТНР-1 и инкубировали 24 часа. Результаты МТТ показали, что внесение DBA11 совместно с ДОКС приводило к увеличению количества нежизнеспособных клеток с $24 \pm 2,4\%$ до $98 \pm 2,3\%$ по сравнению с культурой, обработанной только DBA11 (рисунок 38). Обработка DBA11 ЦМВ инфицированных клеток вызывала гибель $5 \pm 1,4\%$ клеток. Совместное действие DBA11 и ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки привело к значительному (в 2,8 раз) увеличению количества погибших клеток - до $95 \pm 2,1\%$, по сравнению с инфицированной культурой, обработанной ДОКС - $34 \pm 1,1\%$ (рисунок 38).

В связи с тем, что димерный бисбензимидазол DBA11 при совместном действии с ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 восстанавливал

чувствительность опухолевых клеток к действию антибиотика, представляло интерес выяснить механизм действия этого соединения на ЦМВ инфекцию клеток ТНР-1. Для этого была проведена ОТ-ПЦР с праймерами на последовательности 3-х генов ЦМВ: *UL123*, *UL54* и *UL55*, кодирующих сверххранний - IE1-p72, ранний – ДНК-полимеразу и поздний – gB белки ЦМВ. В качестве референсного гена использовали *GUS*. Результаты сравнительного количественного анализа мРНК изученных генов приведены в таблице 6.

Таблица 6. Влияние димерного бисбензимидазола DBA11 на транскрипционную активность генов ЦМВ в клетках ТНР-1

ГЕНЫ ЦМВ	<i>UL123</i>	<i>UL54</i>	<i>UL55</i>
DBA11 -	1±0,12 [*]	1±0,03	1±0,07
DBA11 +	0,64±0,02	0,46±0,03	0,59±0,04

*Среднее значение ±стандартное отклонение (SD) мРНК по результатам 3-х опытов в 3-х повторах. Средние значения количества мРНК в контроле (DBA11-) приняты за 1.

Они показали, что под действием DBA11 статистически значимо (в 1,6 раз) снижается уровень мРНК сверххранного гена *UL123*, и приблизительно в той же степени снижаются уровни транскрипции раннего и позднего генов. Этот результат можно объяснить тем, что подавление активности сверххранного гена приводит к последующему снижению активности ранних и поздних генов, так как экспрессия генома ЦМВ имеет строго упорядоченный – каскадный характер. Полученные данные позволяют предположить, что сверххранний белок ЦМВ является основным вирусным фактором, влияющим на резистентность ТНР-1 к ДОКС.

Результаты использования димерного бисбензимидазола DBA11 показали, что при совместном действии с ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 происходит восстановление чувствительности опухолевых клеток к действию антибиотика.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ ДОКС НА ДНК И АПОПТОЗ КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ

Для изучения молекулярных и клеточных механизмов действия ДОКС на клетки ТНР-1, инфицированные ЦМВ, оценивали влияние ДОКС на целостность ДНК ТНР-1 и программированную гибель клеток.

6.1. ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ИНФИЦИРОВАННЫХ И НЕИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ТНР-1 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДОКС.

Для оценки действия ДОКС на ДНК ТНР-1, инфицированные ЦМВ, клетки заражали с ИМ 5 БОЕ/кл, через 4 часа после заражения вносили 5 мкг/мл ДОКС на 24 часа. Примеры результатов метода TUNEL приведены на рисунке 40.

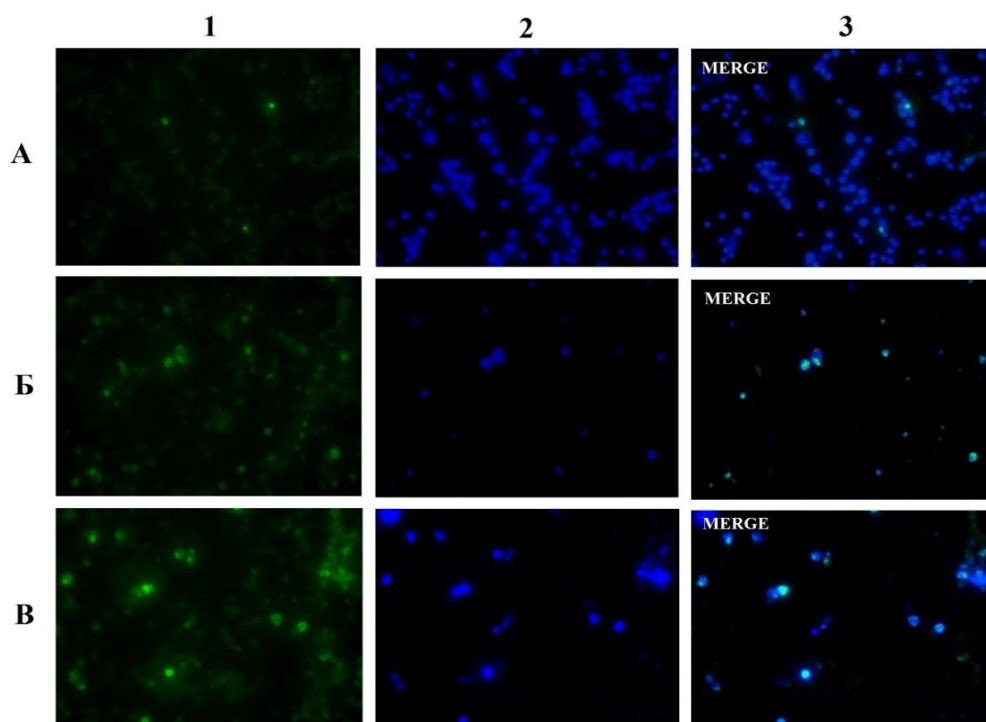


Рисунок 40. Выявление фрагментированной ДНК в клетках ТНР-1 после обработки ДОКС. 1 – Окраска методом TUNEL, 2 - та же культура, окраска ядерным красителем DAPI, 3 – совмещение окраски TUNEL и DAPI. А – неинфицированные клетки, Б – неинфицированные и обработанные ДОКС клетки, В – ЦМВ инфицированные и обработанные ДОКС клетки ТНР-1.

Увеличение 1000х.

Методом TUNEL выявляли разрывы клеточной ДНК в 4-х клеточных популяциях: 1) неинфицированные и не обработанные ДОКС клетки (контроль), 2) неинфицированные клетки, обработанные ДОКС, 3) инфицированные клетки, необработанные ДОКС, 4) инфицированные и обработанные ДОКС клетки THP-1.

Подсчеты клеток, содержащих метку, показали, что количество TUNEL-позитивных клеток в контрольной культуре было незначительным и составляло $1,15 \pm 0,5\%$. После воздействия ДОКС количество клеток с фрагментированной ДНК в неинфицированной популяции значительно возросло и достигло $48,3 \pm 4,5\%$, что статистически значимо превышает этот показатель в контрольной культуре ($p < 0,05$).

В ЦМВ-инфицированной культуре без воздействия ДОКС количество межнуклеосомных разрывов ДНК, выявляемых методом TUNEL, через 24 час сохранялось на том же уровне, что и в контрольной культуре, составив $1 \pm 0,9\%$. После воздействия ДОКС на инфицированные THP-1 количество TUNEL-позитивных клеток увеличилось до $29,3 \pm 7\%$, но не достигло значения для неинфицированных клеток, обработанных ДОКС (рисунок 41).

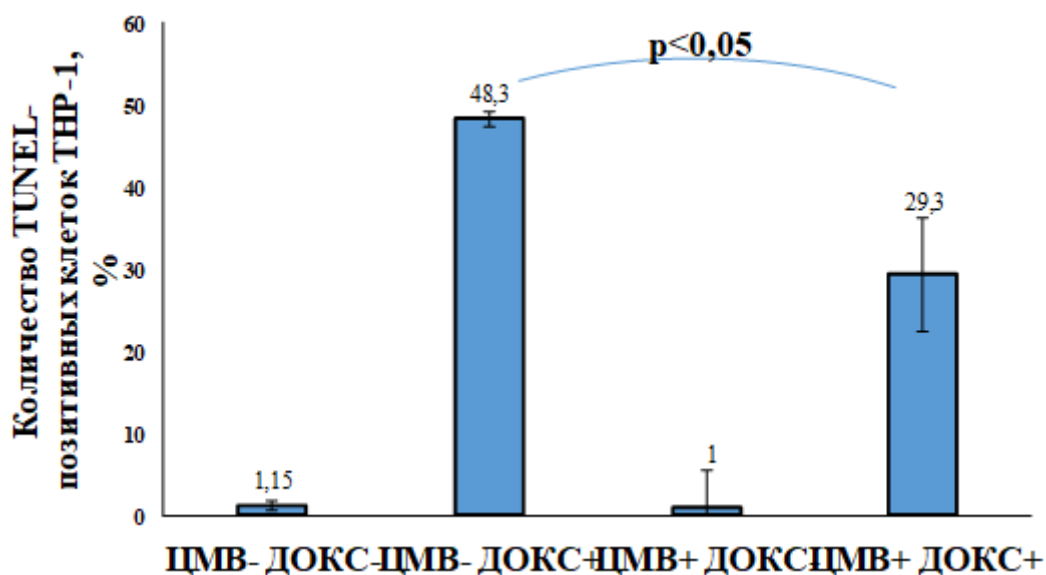


Рисунок 41. Изменение количества клеток, содержащих разрывы ДНК, под действием ДОКС в ЦМВ-инфицированных и неинфицированных THP-1. Метод TUNEL.

Сравнение полученных данных показывает, что при обработке ЦМВ-инфицированных ТНР-1, ДОКС вызывает разрывы ДНК в 1,6 раз меньшем количестве клеток, чем при тех же условиях в неинфицированных клетках ($p < 0,05$). Таким образом, в клетках ТНР-1 после заражения ЦМВ снижается генотоксическое действие ДОКС.

6.2 ОЦЕНКА ДОЛИ КЛЕТОК ТНР-1, СОДЕРЖАЩИХ КАСПАЗЫ 3, 8 И 9 В ЦМВ ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДОКС

Для выяснения механизмов гибели клеток ТНР-1 при обработке ДОКС выявляли маркеры программируемой клеточной гибели - апоптоза. В качестве маркеров были изучены активированные формы каспаз 3, 8 и 9. На рисунке 42 в качестве примера приведены данные изучения каспазы 3.

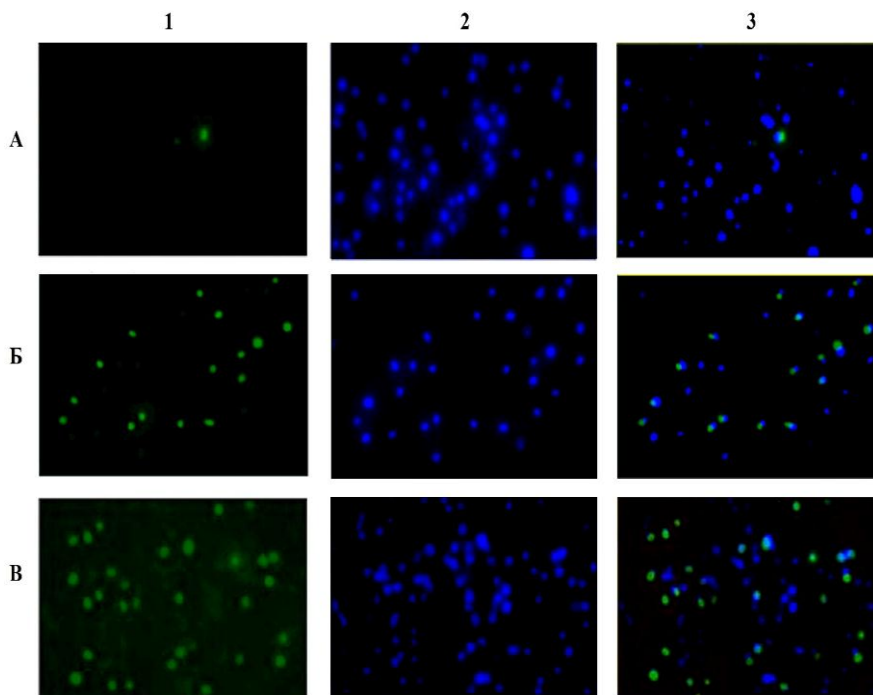


Рисунок 42. Выявление каспазы-3 в клетках ТНР-1, обработанных ДОКС. 1 ряд – Окраска МКА к каспазе 3; 2 ряд - та же культура, окраска ядерным красителем DAPI; 3 ряд – совмещение окраски МКА к каспазе 3 и DAPI. А – неинфицированные клетки; Б – неинфицированные клетки, обработанные ДОКС; В – ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1, обработанные ДОКС. Увеличение 1000х.

Через 4 часа после заражения в клетки вносили ДОКС на 24 часа, затем в инфицированных и неинфицированных популяциях ТНР-1 выявляли каспазы в реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием специфических антител. В контрольной - необработанной ДОКС и неинфицированной ЦМВ культуре, было детектировано незначительное количество клеток, содержащих активированные формы каспаз 3, 8 и 9 ($0,8 \pm 0,5\%$; $1,2 \pm 0,5\%$ и $3,1 \pm 2\%$ соответственно). В ЦМВ-инфицированной культуре ТНР-1 на изученном сроке инфекции доля активных каспаз 3, 8 и 9 незначительно отличалась от контрольных клеток и составляла $4,3 \pm 5\%$; $3,9 \pm 3\%$ и $4,1 \pm 2\%$ соответственно ($p > 0,05$). После обработки ДОКС количество неинфицированных клеток, содержащих каспазы 3, 8 и 9, значительно увеличивалось и достигало значений $41,7 \pm 20\%$; $46,2 \pm 22\%$ и $58,3 \pm 16\%$ соответственно, что статистически значимо отличалось от необработанных антибиотиком клеток ($p < 0,05$). После воздействия ДОКС на инфицированную популяцию ТНР-1, количество клеток, окрашенных антителами к каспазе 3, составило $12 \pm 6\%$; к каспазе 8 – $14 \pm 7\%$ и к каспазе 9 – $15,5 \pm 3\%$ (рисунок 43).

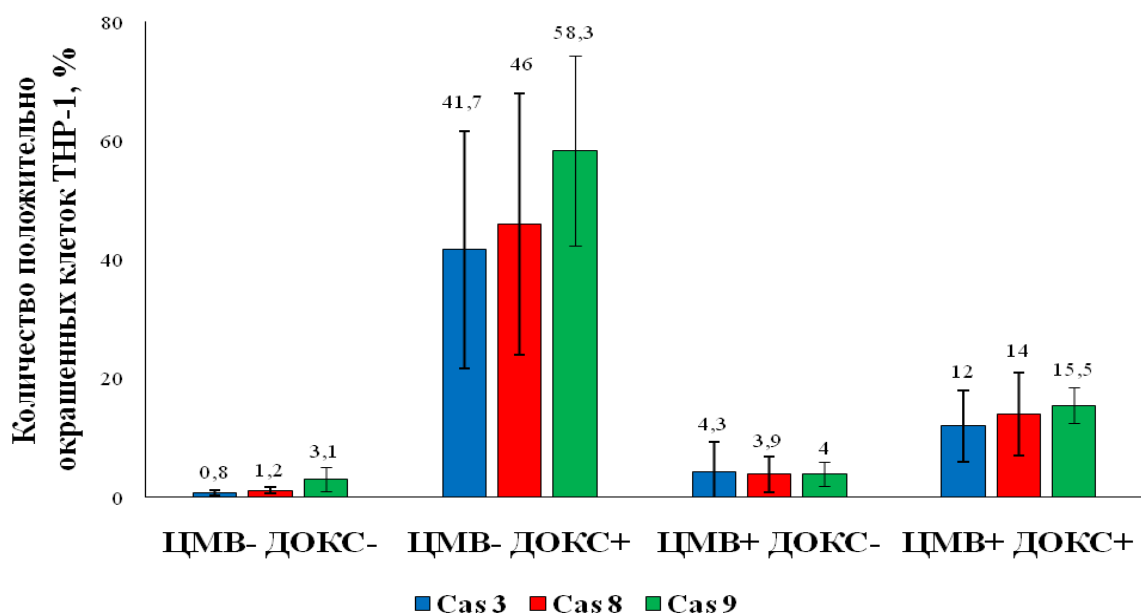


Рисунок 43. Изменения количества клеток, содержащих активированные каспазы 3, 8 и 9 в неинфицированных и ЦМВ-инфицированных ТНР-1 после воздействия ДОКС. Обозначения как на рисунке 21.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в ЦМВ-инфицированных ТНР-1, обработанных ДОКС, доля клеток, содержащих активированные формы каспаз 3, 8 и 9, значительно снижена по сравнению с этим показателем в неинфицированных ТНР-1, обработанных ДОКС (различия статистически значимы, $p < 0,05$). Это указывает на предотвращение апоптоза от действия ДОКС в инфицированной популяции ТНР-1.

ГЛАВА 7. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ДОКС НА СОДЕРЖАНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ P73 И E2F1 В КЛЕТКАХ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ И НЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ

7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОФОРМ БЕЛКА P73 TAp73 И DNp73 В КЛЕТКАХ ТНР-1 ПРИ ЦМВИ И ОБРАБОТКЕ ДОКС

Поскольку в клетках наиболее представленной С-концевой изоформой белка p73 является изоформа альфа, для иммуноблота мы использовали МКА именно к этой изоформе. В лизатах неинфицированных клеток ТНР-1 методом иммуноблота были выявлены две полосы примерно равной и невысокой интенсивности, по молекулярному весу соответствующие полноразмерной изоформе TAp73 α и укороченной изоформе DNp73 α (рисунок 44А).

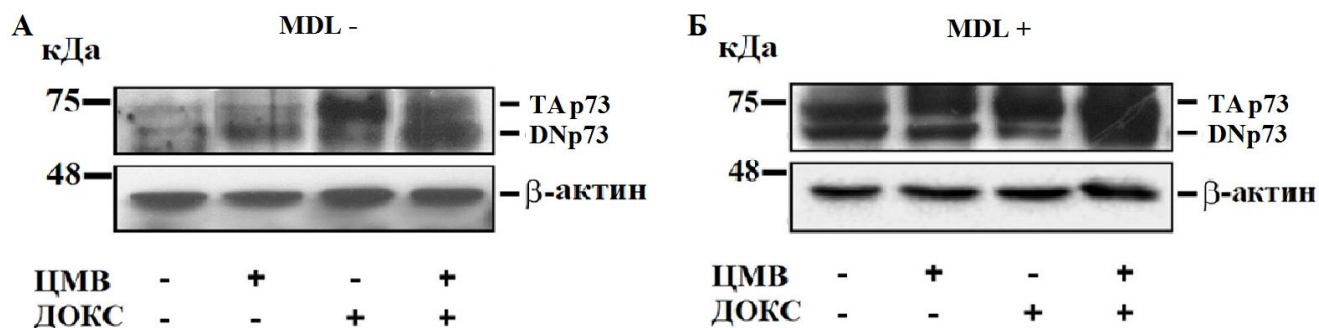


Рисунок 44. (А) Относительное содержание изоформ p73 в клетках ТНР-1, инфицированных ЦМВ и обработанных ДОКС; (Б) Относительное содержание изоформ p73 в клетках ТНР-1, инфицированных ЦМВ и обработанных ДОКС и MDL72.527. Слева – молекулярные массы, кДа; справа – обозначения изоформ p73 – полноразмерной TAp73 и укороченной DNp73. В качестве контроля использован β -актин.

Мы предположили, что установленная нами устойчивость ЦМВ-инфицированных клеток ТНР-1 к противоопухолевому препарату ДОКС может быть связана с дифференциальной регуляцией изоформ белка p73 и изменением

их баланса под действием вируса. Для проверки этого предположения провели количественную оценку уровней изоформ TAr73 и DNp73 методом иммуноблота в неинфицированных и инфицированных клетках THP-1, обработанных ДОКС, а также определили соотношение между ними. Результаты показали, что содержание обеих изоформ в контрольных клетках было низким, а соотношение TAr73/DNp73 составляло $0,86 \pm 0,04$. В инфицированных клетках уровень изоформы DNp73 был значительно повышен, соотношение TAr73/DNp73 составило $0,73 \pm 0,03$ ($p < 0,05$). В неинфицированных клетках ДОКС сместил соотношение в сторону полноразмерной изоформы TAr73, TAr73/DNp73 было равно $1,78 \pm 0,29$ и статистически значимо отличалось от такового в инфицированных клетках, не обработанных ДОКС ($p < 0,05$). Интересно, что в ЦМВ инфицированных клетках, обработанных ДОКС, отмечено небольшое, но статистически значимое увеличение изоформы DNp73, соотношение TAr73/DNp73 уменьшилось до $0,98 \pm 0,07$ ($p < 0,05$) (рисунок 45).

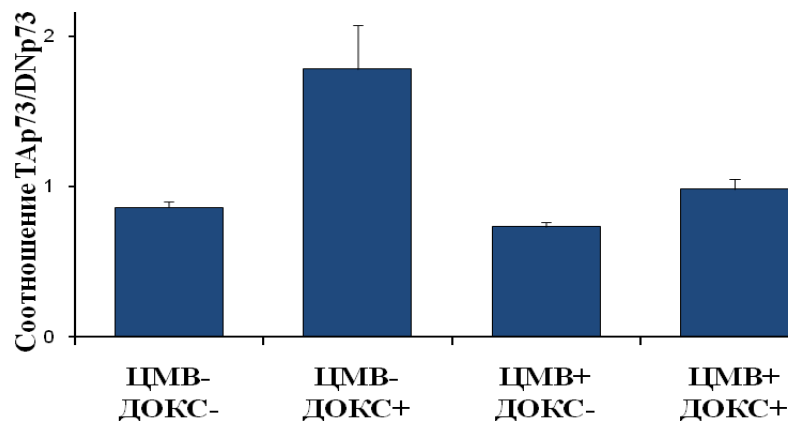


Рисунок 45. Соотношение изоформ белка p73 (TAr73/DNp73), нормализованное в отношении β -актина, в усл.ед.

Полученные результаты показали, что в зараженных клетках THP-1 повышается содержание укороченной изоформы DNp73, тогда как под действием ДОКС резко увеличивается содержание полноразмерной изоформы TAr73, что приводит к изменению отношения изоформ TAr73/DNp73 в инфицированных

клетках, обработанных ДОКС. Следует отметить, что содержание обеих изоформ остается на высоком уровне. Эти данные подтверждают сделанное выше предположение о том, что устойчивость к ДОКС ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1 связана с изменением в соотношении изоформ белка p73.

7.2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА E2F1 В КЛЕТКАХ ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ И ОБРАБОТАННЫХ ДОКС

В связи с имеющимися данными об участии транскрипционного фактора E2F1 в регуляции транскрипции p73 было интересно изучить уровни E2F1 в клетках ТНР-1 методом иммуноблота. Анализ показал, что как ЦМВИ, так и ДОКС повышали уровни E2F1 в 1,7 и 2,5 раза соответственно. После инкубации ЦМВ-инфицированных клеток с ДОКС наблюдалось почти 6-кратное увеличение содержания E2F1 (рисунок 46А).

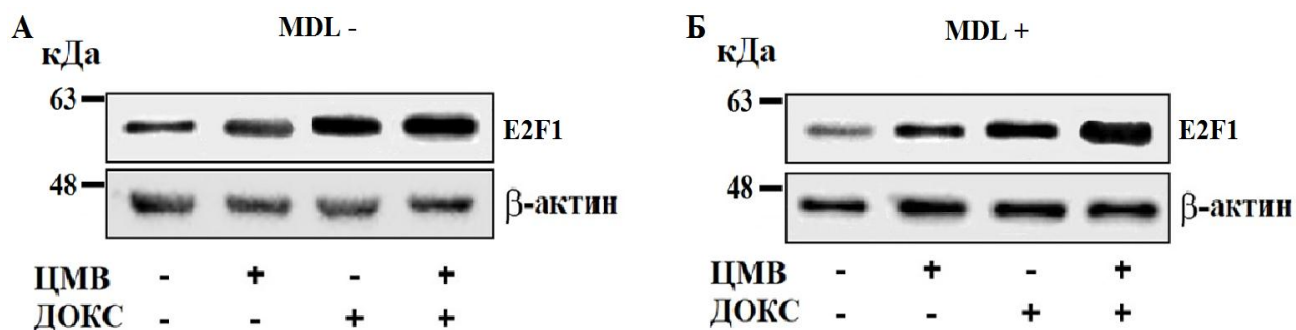


Рисунок 46. (А) Содержание транскрипционного фактора E2F1 в клетках ТНР-1 при ЦМВИ и обработке ДОКС; (Б) Содержание транскрипционного фактора E2F1 в клетках ТНР-1 при ЦМВИ и обработке ДОКС и MDL72.527. Слева - молекулярные массы, кДа; справа – обозначения E2F1 и актина.

Эти результаты позволяют предположить, что путь E2F1/p73 является одним из ключевых механизмов хеморезистентности к ДОКС ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1.

ГЛАВА 8. ДЕЙСТВИЕ MDL72.527 НА ЭКСПРЕССИЮ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ И КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ В КЛЕТКАХ ТНР-1, ЗАРАЖЕННЫХ ЦМВ И ОБРАБОТАННЫХ ДОКС

8.1. ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА E2F1 В КЛЕТКАХ, ЗАРАЖЕННЫХ ЦМВ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДОКС В ПРИСУТСТВИИ MDL72.527

Для выявления влияния метаболизма полиаминов на чувствительность клеток ТНР-1 к ДОКС при ЦМВИ был использован ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527. На основании цитотоксичности по отношению к неинфицированным клеткам ТНР-1 была выбрана концентрация MDL72.527 20мкМ/мл, поскольку при более высоких концентрациях значительно снижается жизнеспособность клеток ТНР-1 (рисунок 22). Инкубация клеток ТНР-1 с MDL72.527 в течение 24 часов снижала уровни E2F1 как в контрольных клетках в 1,8 раза, так и в неинфицированных клетках, обработанных ДОКС в 1,6 раза. В инфицированных клетках, обработанных ДОКС, уровень E2F1 в присутствии MDL72.527 оставался очень высоким, превышая уровень контрольных клеток, обработанных ингибитором, почти в 9 раз (рисунок 46Б).

8.2. ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ TAp73/DNp73 ПОД ДЕЙСТВИЕМ MDL72.527

Инкубация с MDL72.527 привела к значительному увеличению содержания изоформы TAp73 (рисунок 44Б) и, соответственно, увеличению отношения TAp73/DNp73 как в контрольных и ЦМВ инфицированных клетках, так и в клетках, обработанных ДОКС (рисунок 47).

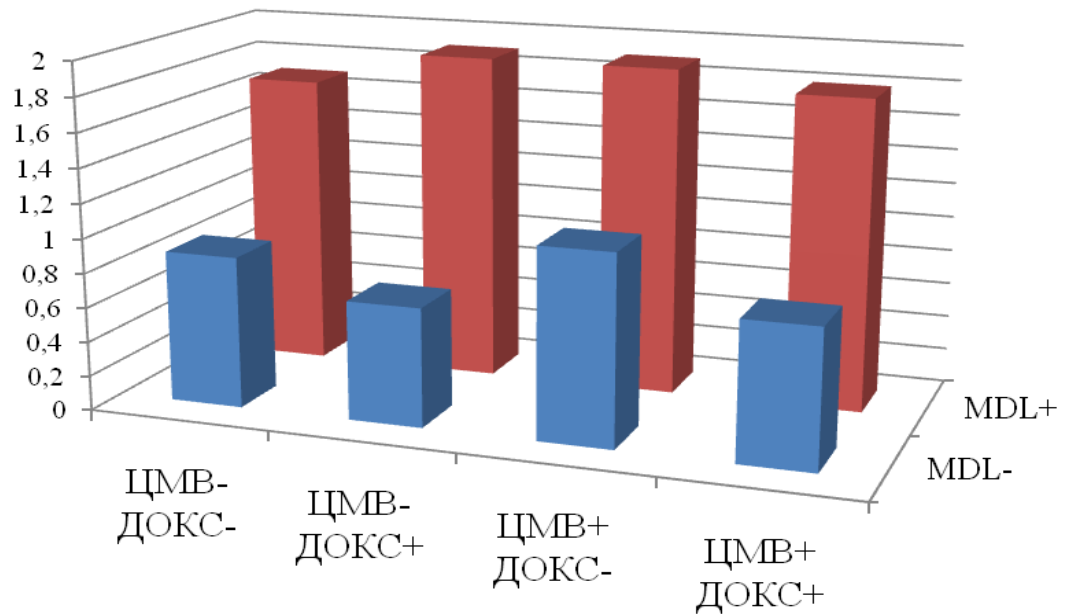


Рисунок 47. Изменение соотношения изоформ белка p73 (TAp73/DNp73) под действием MDL72.527, нормализованное в отношении β -актина, в усл.ед.

Полученные данные указывают на то, что MDL72.527 восстанавливает чувствительность клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, к ДОКС за счет значительного увеличения активности E2F1 и воздействия на молекулярный путь E2F1/p73.

ГЛАВА 9. КОМБИНИРОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОКС И ИНГИБИТОРОВ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦМВ, К ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКА

ДОКС, несмотря на высокую противоопухолевую эффективность, проявляет высокую токсичность. Поэтому представляло интерес изучить, позволит ли совместное использование ДОКС и ингибиторов клеточного метаболизма снизить цитотоксичность препарата для снижения и предотвращения возможных побочных эффектов, не уменьшая при этом эффективности химиотерапии. Для этого провели шахматное титрование с использованием трех концентраций ДОКС (5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл и 1,25 мкг/мл) и трех концентраций каждого ингибитора: MDL72.527 – 20 мкМ/мл, 10 мкМ/мл и 5 мкМ/мл; рапамицина – 9 мкМ/мл, 4,5 мкМ/мл и 2,25 мкМ/мл и Ториона2 – 0,1 мкМ/мл, 0,05 мкМ/мл и 0,025 мкМ/мл. Оценивали жизнеспособность клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, при совместном применении ДОКС и ингибиторов в каждой из 3-х перечисленных концентраций. В качестве сравнения использовали данные, полученные при анализе действия ДОКС в трех изученных концентрациях на инфицированные ЦМВ и неинфицированные клетки ТНР-1 без применения ингибиторов (рис. 48).

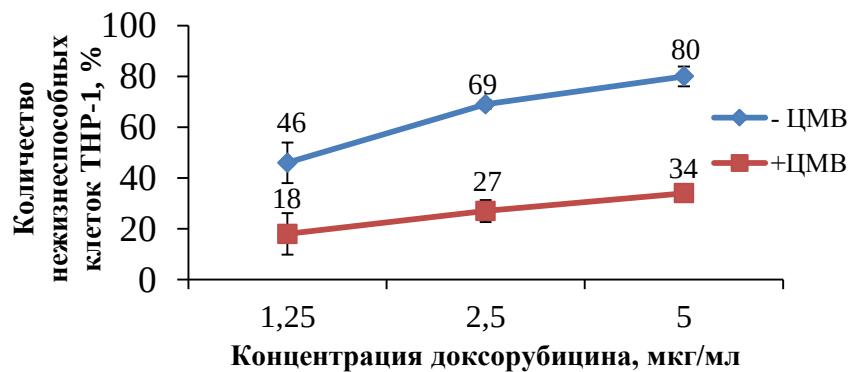


Рисунок 48. Изменение жизнеспособности неинфицированных и инфицированных ЦМВ клеток ТНР-1 при воздействии ДОКС в различных концентрациях.

Было показано, что используемые концентрации соединений (MDL72.527 20мкМ/мл, Торино2 0,05 мкг/мл), вызывающие гибель 20% клеток ТНР-1 и восстанавливающие чувствительность ЦМВ инфицированных клеток к ДОКС, при совместном использовании позволяли снизить используемую концентрацию антибиотика (5 мкг/мл) в 2 раза без снижения эффективности действия на инфицированные опухолевые клетки (рис. 49, 50, 51).

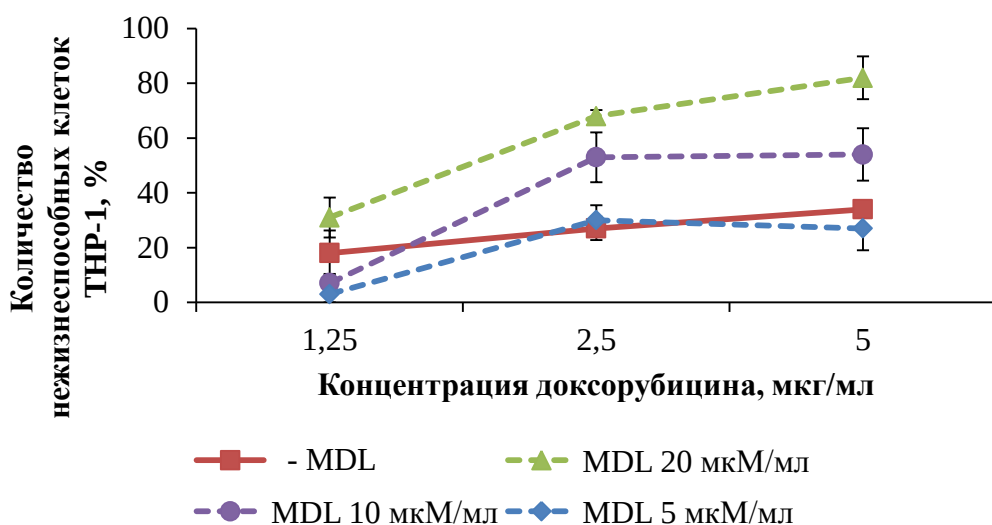


Рисунок 49. Изменение жизнеспособности клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, при сочетанном применении ДОКС и MDL72.527.

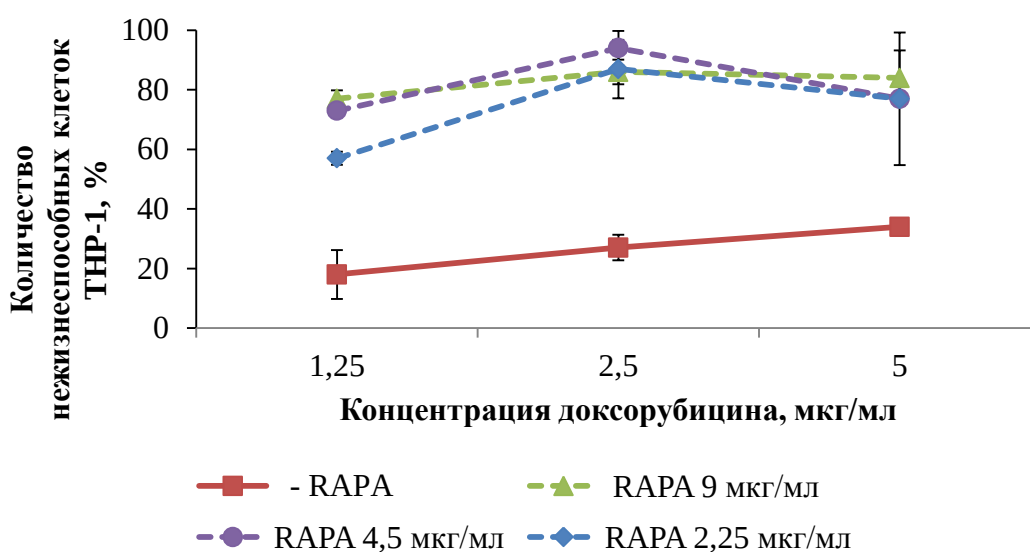


Рисунок 50. Изменение жизнеспособности клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, при сочетанном применении ДОКС и рапамицина.

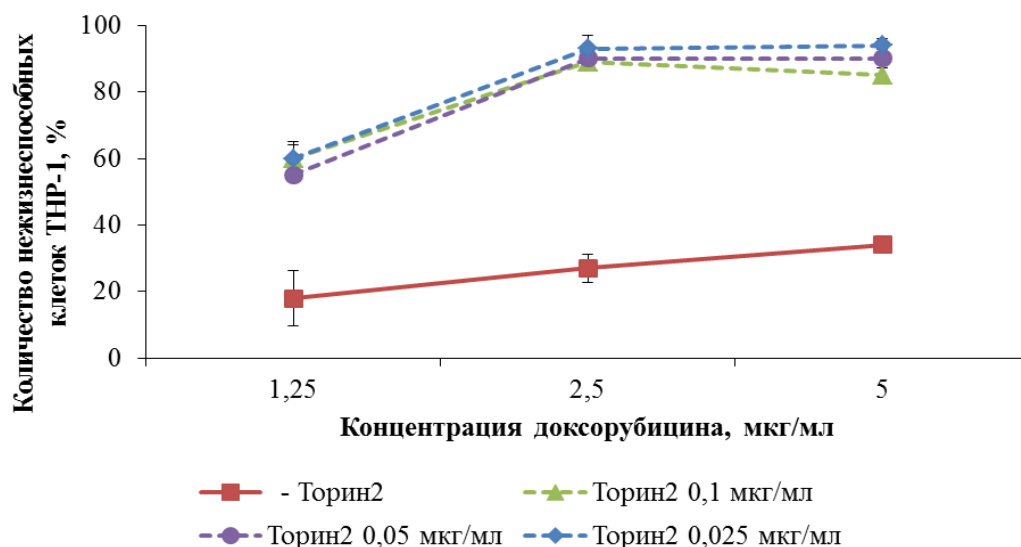


Рисунок 51. Изменение жизнеспособности клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, при сочетанном применении ДОКС и Торин2.

Использование РАПА в исследуемой концентрации 9 мкг/мл, позволило снизить концентрацию ДОКС в 4 раза с сохранением восстановления чувствительности ЦМВ инфицированных клеток к антибиотику (рис. 50).

Снижение резистентности инфицированных клеток также наблюдается при совместном использовании ДОКС и Торина2 в концентрациях 2,5 мкг/мл и 0,025 мкг/мл, соответственно (рис. 51), а также при снижении концентрации ДОКС в 2 раза и РАПА в 2-4 раза (рис. 50).

На основании полученных данных можно заключить, что ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527 и ингибиторы mTOR – РАПА и Торин2 являются перспективными соединениями, позволяющими не только преодолеть резистентность опухолевых клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, к действию противоопухолевого антибиотика ДОКС, но также снизить используемые концентрации высокотоксичного химиопрепарата в 2-4 раза с сохранением эффективности его действия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

ДНК и белки ЦМВ часто обнаруживаются в опухолях разного происхождения, перечень которых приведен в таблице 2. Но до сих пор нет доказательных данных о том, играет ли роль ЦМВ в патогенезе опухолей и какова эта роль. Было показано, что врожденная ЦМВИ – фактор риска развития острого лимфобластного лейкоза [107]. Моноцитарные клетки периферической крови являются одной из первичных мишеней ЦМВ *in vivo*, в этой клеточной популяции часто обнаруживают латентный геном ЦМВ. Для изучения роли латентной вирусной инфекции и реактивации используются несколько клеточных моделей *in vitro* [79]. Среди них одной из широко используемых для исследования латенции ЦМВ является клеточная линия ТНР-1, полученная от больного острым моноцитарным лейкозом [32]. В связи с этим для решения задач настоящей работы были использованы клетки ТНР-1, и на первом этапе работы был проведен экспериментальный анализ динамики ЦМВ инфекции в клетках ТНР-1 в условиях наших опытов.

Было установлено, что в течение 14 с.п.и. ЦМВ с ИМ 5 БОЕ/клетку наблюдались изменения в морфологии клеток, а также в структуре популяции: появление цитоплазматических вакуолей, уменьшение размеров клеток и изменение свойств клеточной мембраны, о чем свидетельствовал распад скоплений клеток - «гроздей», характерных для неинфицированной суспензионной культуры ТНР-1. В инфицированной популяции ТНР-1 концентрация клеток статистически значимо снижалась (на 32%) уже через 1 с.п.и., тогда как в контрольной неинфицированной культуре - увеличивалась в 1,3 раза по сравнению с исходной концентрацией. В инфицированной культуре наблюдался медленный рост на протяжении всего изученного срока инфекции – 14 суток. Уменьшение размеров клеток является одним из признаков апоптоза [301]. Возможно, механизмом гибели клеток ТНР-1 в первые сутки после заражения является апоптоз клеток, зараженных в стадии метафазы митоза, так как установлено, что белки ЦМВ связываются с метафазными хромосомами.

Mücke K и соавт. идентифицировали клеточный рецептор для сверххранного белка ЦМВ IE1-p72 на хромосомах человека и продемонстрировали, что вирусный белок взаимодействует с нуклеосомами путем прямого связывания с гистонами H2A-H2B and H3-H4 [202].

Как показали подсчеты, количество клеток ТНР-1 в инфицированной популяции на протяжении всего периода наблюдений почти не увеличилось. Это можно объяснить тем, что ЦМВ способен блокировать пролиферацию клеток не только в метафазе митоза, но также на других стадиях митоза, а также в других периодах жизненного цикла клетки – в периодах G0, G1, S и M [95].

В динамике ЦМВИ проведен количественный анализ вирусной ДНК, экспрессии вирусного генома на уровне мРНК и содержания белков ЦМВ. Детекцию белков в ЦМВ-инфицированных клетках ТНР-1 проводили двумя методами: на препаратах *in situ* методом иммуноцитохимического окрашивания и в клеточных лизатах методом иммуноблота. Изучены белки, синтезируемые на разных стадиях ЦМВ инфекции. Максимальное количество клеток, содержащих сверххранний (IE1-p72) и ранний (pp65) белки были замечены через 4 часа после заражения. Клетки, содержащие поздний белок gB появлялись в препаратах позже, и их количество достигало максимума на 3 с.п.и. На протяжении последующего периода мы наблюдали уменьшение количества клеток, содержащих вирусные белки, и к 7 с.п.и. клеток, синтезирующих белки ЦМВ, обнаружено не было. Используя более чувствительный метод выявления белков – вестерн блот, нами были получены данные, показывающие, что уже через сутки после заражения в клетках ТНР-1 присутствуют как сверххранние и ранние, так и поздние вирусные белки, но затем количество вирусных белков в популяции падает, и на 14 с.п.и. вирусные белки не обнаруживаются.

Таким образом, можно констатировать, что после проникновения ЦМВ в клетки ТНР-1 начинается каскадный синтез вирусных белков как регуляторных (IE1-p72), так и структурных (pp65 и gB). Однако через 7 с.п.и. сверххранний и ранний вирусные белки в клетках ТНР-1 обнаруживаются слабо и только при выявлении методом иммуноблота, а через 14 с.п.и. все изученные белки ЦМВ не

выявлялись при использовании обоих методов. Сравнительный анализ транскрипции вирусных генов в клетках ТНР-1 показал сходную динамику. Количественное определение мРНК генов *UL122*, *UL83* и *UL55*, кодирующих сверххранний белок IE2-p86, ранний белок pp65 и поздний белок gB ЦМВ, показало, что транскрипционная активность генома ЦМВ увеличивается до 7 с.п.и., а затем резко снижается к 14 с.п.и.

Отсутствие экспрессии вирусных генов на поздних стадиях инфекции могло быть следствием либо элиминации вируса из клеток ТНР-1 либо перехода инфекции в латентную форму. Для выяснения реализации этих возможностей были проведены опыты по выявлению ДНК ЦМВ в клетках ТНР-1 в различные сроки после заражения. ДНК ЦМВ выявляли двумя методами: методом ПЦР в реальном времени в лизатах клеток и методом ДНК-ДНК гибридизации *in situ*. Было установлено, что через 24 часа после инфицирования приблизительно 84% клеток содержали ДНК ЦМВ, концентрация которой составляла в среднем 15 копий на клетку. Относительное содержание вирусной ДНК в популяции ТНР-1 практически не изменялось в динамике инфекции, и концентрация ДНК составляла к 14 суткам в среднем 18 копий на клетку. Полученные данные указывают на переход активной ЦМВ инфекции в первые дни после заражения в латентную форму к 14 суткам после инфицирования. Это заключение было подтверждено в опытах по определению инфекционной активности ЦМВ, которые показали, что на протяжении всего периода исследования продукции инфекционно активного вируса в клетках ТНР-1 выявлено не было. Это означает, что в клетках лейкемии человека ТНР-1 не развивается литическая ЦМВ-инфекция. Тем не менее, вирусная ДНК сохраняется, и инфекция приобретает характеристики латентной формы. Латентное течение ЦМВ-инфекции в опухолевых клетках ТНР-1 было отмечено также другими авторами [286]. Совокупность полученных данных указывает на то, что ЦМВ-инфекция в клетках лейкемии ТНР-1 проявляется в 3-х формах. Эти формы можно условно назвать активной, переходной и латентной. Первая форма (активная), которую мы наблюдали через 1 с.п.и. ТНР-1, характеризуется интенсивной транскрипцией

литических генов (*UL122*, *UL83*, *UL54*) и синтезом литических белков ЦМВ (IE1-p72, pp65, gB). Вторая форма (переходная), 7 с.п.и., отличается активной транскрипцией литических генов наряду со значительным снижением синтеза вирусных белков и повышением экспрессии латентных генов (*UL82*, *UL138*). Третья форма (латентная), 14 с.п.и., характеризуется резким снижением транскрипции литических генов и значительным увеличением транскрипции латентных генов.

Резистентность опухолевых клеток к химиотерапии во многих случаях не удаётся преодолеть. Имеются данные о сниженной чувствительности к химиотерапии клеток не только в солидных опухолях, но в злокачественных опухолях гематологического происхождения, в том числе, инфицированных ЦМВ [30]. Препаратом выбора при лечении разных видов опухолей является доксорубин. Однако эффективность лечения не во всех случаях бывает удовлетворительной. Имеются данные о том, что в 40 % случаев терапия не дает результата [298]. Одна из возможных причин, объясняющих резистентность к противоопухолевым препаратам, может определяться присутствием ЦМВ в раковых клетках. Данных о роли ЦМВ в резистентности злокачественных опухолевых клеток крови было мало, в связи с чем в настоящей работе было изучено влияние ЦМВ на устойчивость опухолевых клеток моноцитарной лейкемии (ТНР-1) к противоопухолевому антибиотику доксорубину.

Оказалось, что ДОКС обладает сильным цитотоксическим действием на клетки ТНР-1: при воздействии ДОКС на неинфицированные ТНР-1 уже через 1 сутки наблюдалась гибель приблизительно 80% клеток. В то же время при воздействии ДОКС на ЦМВ-инфицированные клетки не было выявлено статистически значимых различий в жизнеспособности клеток между обработанной и не обработанной ДОКС культурами.

Среди описанных механизмов действия ДОКС [214], одним из важных является индукция разрывов в молекуле ДНК [186]. Сравнительный анализ влияния ДОКС на фрагментацию ДНК методом TUNEL в инфицированных ЦМВ и неинфицированных клетках ТНР-1, показал, что в контрольной культуре

практически отсутствуют клетки с разрывами ДНК. В ТНР-1 при обработке ДОКС разрывы были выявлены почти в половине клеток (48%), тогда как после воздействия ДОКС на инфицированные ТНР-1 количество TUNEL-позитивных клеток составило 29%. Различие статистически значимо, и это означает, что в ЦМВ-инфицированных клетках существуют механизмы, предотвращающие процессы, приводящие к межнуклеосомным разрывам ДНК, индуцируемым ДОКС.

Нерепарированные повреждения ДНК вызывают остановку пролиферации клеток и/или апоптоз по p53 – зависимому типу [265]. Подсчет клеток в популяции ТНР-1 показал, что при ЦМВ инфекции практически не происходило увеличения концентрации клеток: $574 \times 10^3/\text{мл}$ к 14 суткам против $500 \times 10^3/\text{мл}$ на 1 с.п.и. Это указывает на негативное действие ДОКС на клеточный цикл и деление клеток. Для выяснения роли апоптоза в гибели клеток ТНР-1 при воздействии ДОКС проведены опыты, в которых выявляли маркеры программируемой клеточной гибели, а именно активированные формы каспаз 3, 8 и 9 методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием специфических антител. В культуре ТНР-1 доля клеток, содержащих активные формы каспаз 3, 8 и 9, составляла около 3% и не превышала 5% в ЦМВ-инфицированных клетках. При обработке ДОКС количество апоптозных клеток в среднем увеличивалось до 42-58% в зависимости от каспазы. В ЦМВ-инфицированных ТНР-1, обработанных ДОКС, доля клеток, содержащих активированные формы каспаз 3, 8 и 9, составляло в среднем 12-15%, то есть было более чем в 3 раза меньше по сравнению с этим показателем в неинфицированных ТНР-1, обработанных ДОКС.

Совокупность полученных данных показывает, что при заражении ЦМВ клетки более устойчивы к цитотоксическому и генотоксическому действию ДОКС по сравнению с неинфицированными клетками. Одним из клеточных механизмов резистентности инфицированных опухолевых клеток к ДОКС является ингибирование пролиферации клеток и апоптоза. Наши данные о том, что в клетках ТНР-1 подавляется активность как инициаторных каспаз (8 и 9), так и эффекторной – каспазы 3, означают, что вирус действует одновременно на

разные антиапоптозные мишени. В настоящее время идентифицированы гены и белки ЦМВ, экспрессия которых приводит к предотвращению апоптоза. Наиболее изучены белок pUL36, блокирующий прокаспазу 8, и белок pUL37, связывающийся с проапоптотическими белками Вах и Вак и таким образом препятствующий проницаемости митохондриальной мембраны [80].

Транскрипционный фактор E2F1 является мощным регулятором клеточных процессов. Он способен регулировать как пролиферацию, так и гибель клеток. Его экспрессия и активность строго регулируются в ответ на генотоксический стресс [92]. Представляло интерес выяснить, участвует ли E2F1 в изменении чувствительности клеток к ДОКС. Мы показали, что содержание E2F1 увеличивается как под действием ЦМВ (в 1,7 раз), так и при обработке ДОКС (в 2,5 раз), но наиболее сильное изменение отмечено в инфицированных ТНР-1, обработанных ДОКС – в 6 раз по сравнению с контролем. E2F1 участвует в сложной регуляторной сети [237], которая включает другие факторы транскрипции, такие как p73 [281]. Белок p73, является ключевой мишенью для E2F1 и важным медиатором апоптоза, вызванного E2F1. Активация p73 с помощью E2F1 способствует апоптозу поврежденных клеток, когда p53 дефектен [281]. Мутации в самом E2F1 редки; база данных COSMIC перечисляет 43 соматических мутации в E2F1, по сравнению с 1143, найденными в pRB и 7716 - в p53 [106].

Несмотря на консервативную доменную организацию белков семейства p53, p73 является продуктом гена со сложной геномной организацией. Использование альтернативного промотора *TP73* вместе с дифференциальным сплайсингом С-концевых экзонов приводит к нескольким различным мРНК, которые транслируются в соответствующие изоформы белка, содержащие разные домены. Изоформа TAp73 α обладает проапоптотической функцией, поскольку она способна вызывать остановку клеточного цикла и гибель клетки [27]. В дополнение к транскрипту TAp73 α , его альтернативный сплайсинг в экзоне 3 приводит к появлению укороченной изоформы DNp73 α , в которой отсутствует полностью компетентный домен ТА. Изоформа DNp73 α может проявлять

антиапоптотическую функцию при нормальном развитии клеток и способствовать выживанию раковых клеток [44]. Влияние белка p73 на онкогенез зависит от тонкого баланса между полноразмерной TAp73α и укороченной DNp73α изоформами белка p73 [139]. Методом вестерн блот мы показали, что в клетках моноцитарной лейкемии THP-1 содержание изоформ TAp73α и DNp73α было низким. Ранее показано, что генотоксический стресс, вызванный некоторыми химиотерапевтическими лекарственными средствами (например, цисплатином, доксорубицином и таксолом) продлевает период полужизни белка p73 и усиливает его проапоптотическую активность [45].

Мы обнаружили, что при обработке клеток THP-1 противоопухолевым антибиотиком ДОКС соотношение изоформ TAp73α/DNp73α сдвигалось в сторону полноразмерной изоформы и увеличивалось почти в 2 раза. Заражение ЦМВ, напротив, приводило к изменению соотношения TAp73α/DNp73α в сторону укороченной изоформы. В ЦМВ инфицированных клетках, обработанных ДОКС, наблюдали небольшое, но статистически значимое увеличение содержания изоформы DNp73 по отношению к неинфицированным клеткам, обработанным ДОКС. Таким образом, мы заключили, что изменение соотношения изоформ p73 в сторону укороченной DNp73 ассоциировалось в наших опытах с выживанием части инфицированных клеток при действии ДОКС. Полученные результаты позволяют предположить, что путь E2F1/p73 является ключевым механизмом хеморезистентности к ДОКС ЦМВ инфицированных клеток THP-1. Это предположение согласуется с выводами коллектива авторов о том, что нарушения в регуляции транскрипционных факторов E2F1 и p73 приводят к отбору резистентных клеток в опухолях при лечении генотоксическими препаратами [281]. Ингибирование этого пути может оказаться перспективным, эффективным и лучше переносимым в химиотерапии ДОКС ЦМВ инфицированных лейкемических клеток.

Механизмы установления и поддержания латентности до сих пор не до конца выяснены [93]. Отчасти это связано с трудностями изучения этого процесса *in vivo* [174]. Тем не менее, давно известно, что ЦМВ, заражая клетки-

предшественники костного мозга, может пожизненно присутствовать в миелоидных клетках, в том числе в моноцитах/макрофагах без развития литической инфекции [140, 234]. Поэтому клетки костного мозга играют важную роль как резервуар латентного вируса [233]. В последнее время всё больше работ показывают, что, то состояние вируса, которое считалось спокойным, на самом деле является высокоактивным процессом, характеризующимся экспрессией ряда латентно-ассоциированных вирусных генов. Полагают даже, что истинно латентного состояния не существует [118, 260].

Что касается опухолевых клеток, то многие авторы ассоциируют обнаружение ЦМВ в злокачественных опухолях с участием вируса в модуляции микроокружения опухоли, а также в инициации злокачественной трансформации клеток [263]. Состояние инфекционного процесса в опухолевых клетках не до конца изучено. Мы показали, что в клетках моноцитарной лейкемии ТНР-1 на 7 с.п.и. наблюдается относительно высокая экспрессия вирусных генов *UL122*, *UL54* и *UL83*, характеризующих литическую инфекцию, но соответствующие вирусные белки выявляются на очень низком уровне или не обнаруживаются. В этих же клетках на 7 с.п.и. показана высокая экспрессия генов *UL138* и *UL82*, характеризующих латентную инфекцию. Через 14 суток ЦМВИ уровень транскрипции литических генов снижен до нижнего предела определения ОТ-ПЦР, тогда как уровень транскрипции латентных генов резко увеличен и вирусные белки не обнаруживаются. Это означает, что мы зарегистрировали 2 стадии перехода транскрипционно активной фазы ЦМВИ в опухолевых клетках ТНР-1 в неактивное состояние. Представляло интерес сравнить действие ДОКС на клетки, находящиеся в этих 2-х стадиях. Обработка инфицированных клеток ДОКС на 7 с.п.и. приводила к гибели 24%, ТНР-1, тогда как в неинфицированной популяции – 82% клеток. Сходные результаты получены на 14 с.п.и. ТНР-1: 7% погибших клеток против 79%. На основании полученных данных можно заключить, что после заражения ЦМВ клетки ТНР-1 приобретают устойчивость к действию ДОКС как при транскрипционно активной ЦМВИ, так и при переходе в латентное состояние. Этот результат имеет важное значение, так как ЦМВ в большинстве

зараженных клеток в организме, в том числе и опухолевых клеток [179, 306] находятся в неактивном латентном состоянии, на которое не действуют существующие противовирусные препараты. Поэтому необходимо, чтобы подавление репликации ЦМВ с помощью современных методов лечения проводилось в сочетании с лекарственными средствами, способными непосредственно уничтожать латентно инфицированные клетки.

Молекулярные механизмы, которые использует ЦМВ для формирования резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам, пока остаются предметом исследований. Для изучения механизмов устойчивости ТНР-1 к действию ДОКС мы использовали ингибиторы киназного пути PI3K/Akt/mTOR - LY294002, рапамицин и Торин2 в умеренно цитотоксических концентрациях, вызывающих гибель около 20% контрольных клеток. Выбор этих молекулярных мишеней был сделан на основе анализа серии работ, посвященных действию ЦМВ на моноциты, которые играют решающую роль в распространении вируса в организме. С опухолевыми клетками моноцитарной лейкемии ТНР-1 моноциты периферической крови объединяет неспособность к репликации ЦМВ, но способность поддерживать вирусный геном в неактивном – латентном состоянии. Установлено, что взаимодействие белка gB оболочки ЦМВ с клеточным рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) при вхождении вируса активирует и модулирует фосфоинозитил-3-киназу (PI3K), что вызывает очень быструю активацию супрессора апоптоза Akt [78]. Кроме того, белок pUL38 ЦМВ индуцирует активацию mTOR [200]. Суммируя опубликованные данные о вкладе пути PI3K/Akt/mTOR в развитие ЦМВ инфекции, можно заключить, что активность этого клеточного пути влияет на все стадии ЦМВИ: 1) обеспечивает метаболические потребности для оптимальной продукции вируса во время литической инфекции; 2) модулирует транскрипцию клеточных генов для установления латентности; 3) поддерживает выживание покоящихся инфицированных моноцитов [31, 222].

Рапамицин в условиях наших опытов не оказывал цитотоксическое действие на клетки ТНР-1 в динамике ЦМВИ. Однако при совместном действии с

ДОКС рапамицин значительно увеличивал количество нежизнеспособных клеток (в 2,5-3,8 раз) через 1 и 7 с.п.и. соответственно. Наиболее сильный эффект рапамицина был обнаружен при изучении латентно инфицированных клеток на 14 с.п.и.: количество погибших клеток при совместном действии с ДОКС увеличивалось в 9 раз по сравнению с клетками, обработанными ДОКС без ингибитора mTOR. Сходный эффект показан нами при действии Торина2: увеличение гибели клеток наблюдалась на всех стадиях (1, 7 и 14 с.п.и.), совместное действие с ДОКС увеличивало количество нежизнеспособных клеток в 2,4; 3 и 11,3 раз, соответственно. Полученные данные показали, что оба ингибитора восстанавливали чувствительность зараженных ЦМВ клеток к ДОКС. В то же время Торин2 оказывал более заметное цитотоксическое действие на контрольные клетки. Это можно объяснить тем, что Торин2 ингибирует оба комплекса mTOR и mTORC1, и mTORC2, тогда как рапамицин – только mTORC1. Преодоление резистентности клеток ТНР-1 к ДОКС в присутствии ЦМВ обнаружено нами также при использовании ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) – LY294002. Совместное действие с ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки приводило к увеличению чувствительности к антибиотику уже через 1 сутки воздействия в 2,6 раз. Таким образом, полученные данные показали, что молекулярный путь PI3K/Akt/mTOR является важной мишенью для преодоления резистентности опухолей к антибиотикам и для создания эффективных схем лечения опухолей, инфицированных ЦМВ.

Интерес к пониманию роли биогенных полиаминов в жизненном цикле клетки и в онкогенезе привел к разработке специфических ингибиторов на каждом этапе метаболического цикла полиаминов. С помощью этих инструментов было показано, что в опухолях наблюдаются повышенные уровни полиаминов и что уровень полиаминов влияет на многие, в том числе разнонаправленные процессы [66]. Данные о роли полиаминов в апоптозе противоречивы. По данным одних работ, полиамины действуют как ингибиторы апоптоза, по результатам других – усиливают апоптоз [249]. Биосинтез полиаминов достаточно хорошо изучен, показано, что подавление фермента

орнитиндекарбоксилазы (ODC) ингибитором DFMO, снижает уровни внутриклеточных полиаминов, и это в некоторых случаях оказывает положительное действие при лечении опухолей [33, 41, 248]. Продукты катаболизма полиаминов и ферменты, участвующие в катаболических процессах также влияют на жизненно важные клеточные процессы и предполагают, что они могут участвовать в этиологии некоторых раковых заболеваний [42]. Одним из хорошо изученных ингибиторов катаболизма полиаминов является MDL72.527 - ингибитор полиаминооксидаз (SMO и APO/SSAT), участвующих в деградации полиаминов. Мы показали, что использование этого ингибитора восстанавливало чувствительность клеток ТНР-1 к ДОКС как при активной, так и при латентной ЦМВИ. Напротив, ингибитор ODC DFMO не оказывал статистически значимого влияния на жизнеспособность ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1, обработанных ДОКС.

Для выяснения молекулярных механизмов действия MDL72.527 мы изучили влияние этого ингибитора на уровень транскрипционных факторов E2F1 и p73. Показано, что MDL72.527 снижал уровни E2F1 как в контрольных клетках ТНР-1, так и в неинфицированных клетках, обработанных ДОКС. В инфицированных клетках, обработанных ДОКС, уровень E2F1 в присутствии MDL72,527 оставался очень высоким, превышая уровень контрольных клеток, обработанных ингибитором, почти в 9 раз. Инкубация с MDL72.527 также привела к значительному увеличению отношения TAp73/DNp73 в инфицированных клетках. Таким образом, можно заключить, что MDL72.527 восстанавливает чувствительность клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, к ДОКС используя в качестве мишеней молекулярный путь E2F1/p73.

Наряду с клеточными факторами в установлении резистентности и восстановлении чувствительности к ДОКС участвуют вирусные факторы. Полученные нами данные о восстановлении чувствительности к ДОКС в клетках, обработанных DBA11, показали, что этот эффект ассоциируется с подавлением транскрипционной активности сверххраненного белка ЦМВ IE1-p72.

Суммируя данные настоящей работы и имеющиеся в литературе, можно заключить, что в установлении резистентности к ДОКС опухолевых клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, принимают участие, как клеточные факторы, так и белки, кодируемые вирусом. Активность метаболического пути PI3K/Akt/mTOR и цикла биогенных полиаминов обеспечивают выживание клеток при цитотоксическом действии ДОКС. В противодействии ДОКС участвуют также белки ЦМВ IE1/IE2, pUL36-pUL38. Очевиден также вклад транскрипционных факторов E2F1 и p73, так как нарушение регуляции молекулярного пути E2F1/p73 блокирует апоптоз в ЦМВ-инфицированных и не инфицированных клетках и препятствует действию ДОКС. Важные результаты получены при изучении латентно инфицированных клеток. Они подчеркивают целесообразность выявления опухолей, содержащих вирусные нуклеиновые кислоты и белки, а также использования самых современных подходов, таких как система CRISPR/Cas9, для ликвидации инфицированных клеток. Полученные результаты указывают на клеточные и молекулярные мишени, которые могут стать основой для создания новых лечебных и профилактических препаратов, а также помогут в разработке более эффективных схем терапии опухолевых заболеваний у пациентов, инфицированных ЦМВ.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный количественный анализ вирусной ДНК, мРНК, белков и инфекционной активности ЦМВ показал, что в клетках лейкемии человека ТНР-1 ЦМВ инфекция имеет абортивный характер и характеризуется активной формой (1 с.п.и.), переходной формой (7 с.п.и.) и латентной формой (14 с.п.и.) без продукции вируса на всех стадиях инфекции.

2. На модели гематологической опухоли – клеток лейкемии ТНР-1, впервые показано, что заражение ЦМВ вызывает устойчивость к цитотоксическому действию ДОКС как при активной, так и при латентной форме инфекции.

3. Впервые показано, что в инфицированных ЦМВ клетках ТНР-1 предотвращались разрывы ДНК при действии ДОКС и в 4 раза снижалась экспрессия маркеров апоптоза - активированных форм каспаз 3, 8 и 9, по сравнению с неинфицированными опухолевыми клетками.

4. Количественный анализ двух изоформ белка p73 - полноразмерной TAp73 и укороченной DNp73 – впервые показал, что в клетках ТНР-1, инфицированных ЦМВ, под действием ДОКС происходит смещение изоформ в сторону антиапоптозной изоформы DNp73 и 6-ти кратное повышение содержания транскрипционного фактора E2F1.

5. Впервые показано, что ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527 восстанавливает чувствительность к ДОКС клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ. Преодоление резистентности сопровождается увеличением соотношения TAp73/DNp73 и повышением уровня E2F1 в 9 раз.

6. Установлено снижение жизнеспособности клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, под действием ДОКС в присутствии ингибиторов PI3K - LY294002 и mTOR - рапамицина и Торина2, что указывает на участие молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR в формировании устойчивости к ДОКС клеток ТНР-1, активно и латентно инфицированных ЦМВ.

7. Впервые показано, что димерный бисбензимидазол DBA11, специфически взаимодействующий с ДНК, подавляет транскрипционную активность сверххранного гена ЦМВ UL123 и повышает гибель инфицированных клеток ТНР-1 под действием ДОКС, указывая на участие вирусного гена в восстановлении чувствительности опухолевых клеток к действию антибиотика.

8. Комбинированное применение ДОКС и ингибиторов метаболизма клеток (цикла биогенных полиаминов и пути mTOR) позволило в 2-4 раза снизить действующие концентрации соединений при сохранении эффективности восстановления чувствительности клеток ТНР-1 к ДОКС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БОЕ – бляшкообразующая единица
- ВСЖ – вируссодержащая культуральная жидкость
- ГАНЦ – ганцикловир
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДОКС – доксорубин
- дцДНК – двуцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИМ – инфекционная множественность
- МКА – моноклональные антитела
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПА – полиамины
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- с.п.и. – сутки после инфицирования
- ФЛЭЧ – фибробласты легкого эмбриона человека
- ФСБ – фосфатный солевой буфер
- ЦД₅₀ – хроническая цитотоксичность
- ЦМВ – цитомегаловирус человека
- ЦМВИ – цитомегаловирусная инфекция
- ЦПД – цитопатическое действие
- ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
- CD – кластер дифференцировки
- DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DMEM – минимальная среда Игла в модификации Dulbecco
- МІЕР - главный сверххранний промотер ЦМВ
- TUNEL – Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling
- vICA – viral inhibitor of caspase-8-induced apoptosis
- vMIA – viral mitochondrial inhibitor of apoptosis

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айсина Д. Е. Особенности связывания miRNA с mRNA генов семейства E2F / Д. Е. Айсина, Р. Е. Ниязова, Е. Н. Имянитов, А. Т. Иващенко // Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2018. – № 16. – С. 528-530.
2. Алясова А. В. Новые представления о механизмах действия доксорубина и озона на злокачественные клетки печени / А. В. Алясова, И. Г. Терентьев, С. Н. Цыбусов, М. В. Ведунова, Т. А. Мищенко, К. А. Шахова, К. Н. Конторщикова // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9. – № 2. – С. 145-149.
3. Асатулова А. В. Изоформы белка p53: роль в норме и патологии, особенности выявления и клиническое значение / А. В. Асатулова // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 3. – С. 9-13.
4. Барычева Л. Ю. Клинические и морфологические особенности пороков развития у детей с врожденными цитомегаловирусной и токсоплазменной инфекциями / Л. Ю. Барычева, М. В. Голубева, М. А. Кабулова И. В. Косторная // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2015. – Т. 60. – № 3. – С. 50-57.
5. Валиахметова Э. Ф. Перспективы таргетной терапии глиом низкой степени злокачественности у детей / Э. Ф. Валиахметова, Л. А. Ясько, Л. И. Папуша, А. Е. Друй, А. И. Карачунский // Успехи молекулярной онкологии. – 2019. – Т. 6. – № 2. – С. 28-41.
6. Верещагин М. Ю. Частота вирусассоциированного рака полости носа и околоносовых пазух в Архангельской области / М. Ю. Верещагин, А. У. Минкин, М. В. Макарова // Опухоли головы и шеи. – 2018. – Т. 8. – № 4. – С. 56-60.
7. Емельянова С. С. Участие транскрипционных факторов E2F1 и p73 в формировании резистентности к доксорубину опухолевых клеток ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом человека / С. С. Емельянова, Я. Ю.

- Чернорыж, К. И. Юрлов, Н. Е. Федорова, А. В. Иванов, С. Н. Кочетков, В. Н. Вербенко, А. А. Куш, Г. Р. Виноградская // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 7. – С. 527-530.
8. Жукова Л. И. Цитомегаловирусная инфекция у беременных женщин с ВИЧ-инфекцией / Л. И. Жукова, Ю. Г. Шахвердян // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2018. – Т. 10. – № 3. – С. 40-47.
 9. Журавская А. Ю. Малая ГТФаза Arf6 активирует mTORC 1-зависимый сигнальный путь и стимулирует рост клеток глиобластомы / А. Ю. Журавская, А. В. Комельков, Е. М. Чевкина // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14. – № 2. – С. – 91-98.
 10. Зупанец И. А. Изучение влияния производных глюкозамина на доксорубин-индуцированную гибель клеток в эксперименте / И. А. Зупанец, Т. С. Сахарова, Е. В. Ветрова, Е. А. Зупанец // Вестник фармации. – 2015. – Т. 67. – № 1. – С. 83-88.
 11. Климова Р. Р. Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах / Р. Р. Климова, Е. Д. Момотюк, Н. А. Демидова, Я. Ю. Чернорыж, В.С. Коваль, А. А. Иванов, А. Л. Жузе, А. А. Куш // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62. – № 4. – С. 162-168.
 12. Клиникова М. Г. Кардиотоксический и дислипидемический эффект доксорубина и амида бетулоновой кислоты / М. Г. Клиникова, Е. Л. Лушникова Е. В. Колдышева, Т. Г. Толстикова, И. В. Сорокина, Е. И. Южик, М. М. Мжельская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162. – № 8. – С. 247-252.
 13. Косова И. В. Иммуногистохимические аспекты рака мочевого пузыря на фоне вирусной инфекции / И. В. Косова, О. Б. Лоран, Л. А. Синякова, Л. В. Гундорова, В. А. Косов, И. Е. Погодина, Д. Н. Колбасов // Онкоурология. – 2018. – Т. 14. – № 2. – С. 142-154.
 14. Неборак Е. В. Гомоцистеин и полиамины: метаболическая взаимосвязь и ее клиническое значение при химиотерапии ингибиторами фолатного обмена /

- Е. В. Неборак, А. В. Лебедева, Е. Г. Головня, И. О. Горячева, В. Н. Байкова // Онкопедиатрия. – 2017. – Т. 4. – № 1. – С. 56-67.
15. Неродо Г. А. Наличие вирусной ДНК в тканях больных раком вульвы / Г. А. Неродо, Т. А. Зыкова, В. А. Иванова, Е. А. Неродо // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 12. – С. 89-95.
 16. Петрова К. К. Причины и диагностика раннего невынашивания при цитомегаловирусной инфекции / К. К. Петрова // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2017. – № 64. – С. 50-54.
 17. Полатова Д. Ш. Цитогенетические изменения в лимфоцитах периферической крови в оценке эффективности лечения больных с остеогенной саркомой / Д. Ш. Полатова, М. А. Гафур-Ахунов, М. С. Гильдиева // Российский онкологический журнал. – 2010. – № 3. – С. 16-18.
 18. Пономарев А. В. Связь делеций и точечных мутаций гена p53 с резистентностью клеточных линий метастатической меланомы кожи человека к аранозе / А. В. Пономарев, А. А. Солодовник, А. С. Мкртчян, Ю. П. Финашутина, А. А. Турба, В. А. Мисюрин, А. В. Мисюрин, М. А. Барышникова // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17. – № 1. – С. 64-69.
 19. Самоукина А. М. и др. Бактериально-вирусные ассоциации полости рта у здоровых людей и при новообразованиях челюстно-лицевой области / А. М. Самоукина, М. В. Насонова, Е. С. Михайлова, Ю. А. Алексеева, Н. А. Веселова // Лечение и профилактика. – 2016. – № 4. – С. 29-34.
 20. Сахарнов Н. А. Особенности регуляции апоптоза клеток, инфицированных цитомегаловирусом и вирусом эпштейна-барр / Н. А. Сахарнов, О. В. Уткин, Д. И. Князев, Е. Н. Филатова, В. Д. Цветкова // Успехи современной биологии. – 2017. – Т. 137. – № 4. – С. 387-397.
 21. Силачев Д. Н. Роль полиаминов в жизнедеятельности клеток репродуктивной системы / Д. Н. Силачев, Е. Ю. Плотников, К. В. Горюнов, А. Ю. Романов, М. В. Плосконос, Н. В. Долгушина, А.А. Николаев, Д. Б. Зоров, Г. Т. Сухих // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 3. – С. 164-172.

22. Спирина Л. В. Экспрессия транскрипционных и ростовых факторов в опухолевой ткани больных раком щитовидной железы, связь с уровнем активации АКТ/m-TOR сигнального пути / Л. В. Спирина, С. Ю. Чижевская, О. С. Зайцева, И. В. Кондакова // Злокачественные опухоли. – 2016. – № 4-S1. – С. 311-312.
23. Федорова Н. Е. Блок клеточной пролиферации и патология митоза в клетках, инфицированных цитомегаловирусом: роль периода клеточного цикла в момент заражения / Н. Е. Федорова, А. А. Меджидова, М. Г. Меджидова, А. А. Куш // Доклады академии наук. – 2003. – Т. 392. – № 4. – С. 552-555.
24. Харламова Ф. С. Роль герпесвирусной инфекции IV, V и VI типов в инфекционной и соматической патологии у детей / Ф. С. Харламова, Н. Ю. Егорова, О. В. Шамшева, В. Ф. Учайкин, О. В. Молочкова, Е. В. Новосад, Т. М. Лебедева, Е. В. Симонова // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2017. – Т. 96. – № 4. – С. 42-47.
25. Цирульникова О. М. Клиническое значение цитомегаловирусной инфекции у детей после трансплантации печени / О. М. Цирульникова, И. В. Жилкин, Д. Г. Ахаладзе // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18. – № 1. – С. 67-77.
26. Чернова Н. Г. Сравнительный анализ серологических маркёров герпесвирусных инфекций и количественных иммуноглобулинопатий у первичных больных ангиоиммуобластной т-клеточной лимфомой / Н. Г. Чернова, Д. С. Тихомиров, Н. П. Соболева, С. А. Марьина, Ю. В. Сидорова, М. Н. Сеницына, В. Н. Двирнык, С. М. Куликов, Т. А. Туполева, Е. Е. Звонков // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – № 4. – С. 171-176.
27. Acedo P. Activation of TAp73 and inhibition of TrxR by Verteporfin for improved cancer therapy in TP53 mutant pancreatic tumors / P. Acedo, A. Fernandes, J. Zawacka-Pankau // Future science OA. – 2019. – Т. 5. – № 2. – С. FSO366.

28. Akhtar W. Therapeutic evolution of benzimidazole derivatives in the last quinquennial period / W. Akhtar, M. F. Khan, G. Verma, M. Shaquiquzzaman, M.A. Rizvi, S. H. Mehdi, M. Akhter, M. M. Alam // *European journal of medicinal chemistry*. – 2017. – T. 126. – C. 705-753.
29. Alla V. E2F1 in melanoma progression and metastasis / V. Alla, D. Engelmann, A. Niemetz, J. Pahnke, A. Schmidt, M. Kunz, S. Emmrich, M. Steder, D. Koczan, B. M. Pützer // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2010. – T. 102. – № 2. – C. 127-133.
30. Allart S. Human cytomegalovirus induces drug resistance and alteration of programmed cell death by accumulation of ΔN -p73 α / S. Allart, H. Martin, C. Détraves, J. Terrasson, D. Caput, C. Davrinche // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – T. 277. – № 32. – C. 29063-29068.
31. Altman A. M. HCMV modulation of cellular PI3K/AKT/mTOR signaling: New opportunities for therapeutic intervention? / A. M. Altman, J. Mahmud, Z. Nikolovska-Coleska, G. Chan // *Antiviral research*. – 2019 – T. 163. – C. 82-90.
32. Arcangeletti M. C. Human cytomegalovirus reactivation from latency: Validation of a “switch” model in vitro / M. C. Arcangeletti, R. V. Simone, I. Rodighiero, F. De Conto, M. C. Medici, C. Maccari, C. Chezzi, A. Calderaro // *Virology journal*. – 2016. – T. 13. – № 1. – C. 179.
33. Bachmann A. S. Polyamine synthesis as a target of MYC oncogenes / A. S. Bachmann, D. Geerts // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – T. 293. – № 48. – C. 18757-18769.
34. Bae D. H. The old and new biochemistry of polyamines / D. H. Bae, D. J. Lane, P. J. Jansson, D. R. Richardson // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2018. – T. 1862. – № 9. – C. 2053-2068.
35. Bagchi S. The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F / S. Bagchi, R. Weinmann, P. Raychaudhuri // *Cell*. – 1991. – T. 65. – № 6. – C. 1063-1072.

36. Bai B. Human cytomegalovirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis / B. Bai, X. Wang, E. Chen, H. Zhu, // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7. – № 47. – C. 76735-76742.
37. Baldini E. Cyclin A and E2F1 overexpression correlate with reduced disease-free survival in node-negative breast cancer patients / E. Baldini, A. Camerini, A. Sgambato, T. Prochilo, A. Capodanno, F. Pasqualetti, C. Orlandini, L. Resta, G. Bevilacqua, P. Collecchi // *Anticancer research*. – 2006. – T. 26. – № 6B. – C. 4415-4421.
38. Barra F. Investigational PI3K/AKT/mTOR inhibitors in development for endometrial cancer / F. Barra, G. Evangelisti, L. Ferro Desideri, S. Di Domenico, D. Ferraioli, V. G. Vellone, F. De Cian, S. Ferrero // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2019. – T. 28. – № 2. – C. 131-142.
39. Barrett M. P. Minor groove binders as anti-infective agents / M. P. Barrett, C. G. Gemmell, C. J. Suckling // *Pharmacology & therapeutics*. – 2013. – T. 139. – № 1. – C. 12-23.
40. Baryawno N. Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target / N. Baryawno, A. Rahbar, N. Wolmer-Solberg, C. Taher, J. Odeberg, A. Darabi, Z. Khan, B. Sveinbjornsson, O.-M. FuskevAg, L. Segerstrom, M. Nordenskjold, P. Siesjo, P. Kogner, J. Inge Johnsen, C. Soderberg-Naucleer // *The Journal of clinical investigation*. – 2011. – T. 121. – № 10. – C. 4043-4055.
41. Bassiri H. Translational development of difluoromethylornithine (DFMO) for the treatment of neuroblastoma / H. Bassiri, A. Benavides, M. Haber, S. K. Gilmour, M. D. Norris, M. D. Hogarty // *Translational pediatrics*. – 2015. – T. 4. – № 3. – C. 226-238.
42. Battaglia V. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention / V. Battaglia, C. D. Shields, T. Murray-Stewart, R. A. Casero // *Amino acids*. – 2014. – T. 46. – № 3. – C. 511-519.
43. Beisser P. S. Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes / P. S. Beisser, L. Laurent, J. L.

- Virelizier, S. Michelson // *Journal of virology*. – 2001. – T. 75. – № 13. – C. 5949-5957.
44. Belloni L. DNp73 α protects myogenic cells from apoptosis / L. Belloni, F. Moretti, P. Merlo, A. Damalas, A. Costanzo, G. Blandino, M. Levrero // *Oncogene*. – 2006. – T. 25. – № 25. – C. 3606-3612.
 45. Ben-Yehoyada M. c-Abl tyrosine kinase selectively regulates p73 nuclear matrix association / M. Ben-Yehoyada, I. Ben-Dor, Y. Shaul // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278. – № 36. – C. 34475-34482.
 46. Bertacchini J. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia / J. Bertacchini, N. Heidari, L. Mediani, S. Capitani, M. Shahjahani, A. Ahmadzadeh, N. Saki // *Cellular and molecular life sciences*. – 2015. – T. 72. – № 12. – C. 2337-2347.
 47. Bhattacharjee B. Genetic analysis of cytomegalovirus in malignant gliomas / B. Bhattacharjee, N. Renzette, T. F. Kowalik // *Journal of virology*. – 2012. – T. 86. – № 12. – C. 6815-6824.
 48. Bianchi E. Human cytomegalovirus and primary intracranial tumours: frequency of tumour infection and lack of correlation with systemic immune anti-viral responses / E. Bianchi, P. Roncarati, O. Hougrand, V. Guérin-El Khourouj, R. Boreux, J. Kroonen, D. Martin P. Robe B. Rogister P. Delvenne, M. Deprez // *Neuropathology and applied neurobiology*. – 2015. – T. 41. – № 2. – C. e29-e40.
 49. Billant O. The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73: A family affair / O. Billant, A. Leon, S. Le Guellec, G. Friocourt, M. Blondel, C. Voisset // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7. – № 43. – C. 69549-69564.
 50. Binkhathlan Z. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives / Z. Binkhathlan, A. Lavasanifar // *Current cancer drug targets*. – 2013. – T. 13. – № 3. – C. 326-346.
 51. Biolatti M. et al. The human cytomegalovirus tegument protein pp65 (pUL83): a key player in innate immune evasion / M. Biolatti, V. Dell'Oste, M. De Andrea, S. Landolfo // *New microbiologica*. – 2018. – T. 41. – C. 87-94.

52. Biswas A. K. Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage / A. K. Biswas, D. G. Johnson // *Cancer research*. – 2012. – T. 72. – № 1. – C. 13-17.
53. Boehme K. W. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells / K. W. Boehme, M. Guerrero, T. Compton // *The Journal of Immunology*. – 2006. – T. 177. – № 10. – C. 7094-7102.
54. Boehmer P., Nimonkar A. Herpes virus replication / P. Boehmer, A. Nimonkar // *IUBMB life*. – 2003. – T. 55. – № 1. – C. 13-22.
55. Bossler F. PI3K/AKT/mTOR Signaling Regulates the Virus/Host Cell Crosstalk in HPV-Positive Cervical Cancer Cells / F. Bossler, K. Hoppe-Seyler, F. Hoppe-Seyler // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – T. 20. – № 9. – C. 2188.
56. Botto S. IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin / S. Botto, D. N. Streblow, V. DeFilippis, L. White, C. N. Kreklywich, P. P. Smith, P. Caposio // *Blood*. – 2011. – T. 117. – № 1. – C. 352-361.
57. Bozidis P. Mitochondrial and secretory human cytomegalovirus UL37 proteins traffic into mitochondrion-associated membranes of human cells / P. Bozidis, C. D. Williamson, A. M. Colberg-Poley // *Journal of virology*. – 2008. – T. 82. – № 6. – C. 2715-2726.
58. Buehler J. Opposing regulation of the EGF receptor: a molecular switch controlling cytomegalovirus latency and replication / J. Buehler, S. Zeltzer, J. Reitsma, A. Petrucelli, M. Umashankar, M. Rak, P. Zagallo, J. Schroeder, S. Terhune, F. Goodrum // *PLoS pathogens*. – 2016. – T. 12. – № 5. – C. e1005655.
59. Burke H. G. Correction: crystal structure of the human cytomegalovirus glycoprotein B / H. G. Burke, E. E. Heldwein // *PLoS pathogens*. – 2015. – T. 11. – № 11. – C. e1005300.

60. Cagel M. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside / M. Cagel, E. Grotz, E. Bernabeu, M. A. Moreton, D. A. Chiappetta // *Drug Discovery Today*. – 2017. – T. 22. – № 2. – C. 270-281.
61. Candi E. How the TP 53 Family Proteins TP 63 and TP 73 Contribute to Tumorigenesis: Regulators and Effectors / E. Candi, M. Agostini, G. Melino, F. Bernassola // *Human mutation*. – 2014. – T. 35. – № 6. – C. 702-714.
62. Cannon M. J. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection / M. J. Cannon, T. B. Hyde, D. S. Schmid // *Reviews in medical virology*. – 2011. – T. 21. – № 4. – C. 240-255.
63. Carrington P. E. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8 / P. E. Carrington, C. Sandu, Y. Wei, J. M. Hill, G. Morisawa, T. Huang, E. Gavathiotis, Y. Wei, M. H. Werner // *Molecular cell*. – 2006. – T. 22. – № 5. – C. 599-610.
64. Caru M. et al. Doxorubicin treatments induce significant changes on the cardiac autonomic nervous system in childhood acute lymphoblastic leukemia long-term survivors / M. Caru, D. Corbin, D. Perie, V. Lemay, J. Delfrate, S. Drouin, L. Bertout, M. Krajcinovic, C. Laverdiere, G. Andelfinger, D. Sinnett, D. Curnier // *Clinical Research in Cardiology*. – 2019. – T. 108. – № 9. – C. 1000-1008.
65. Casero Jr R. A. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases / Jr R. A. Casero, L. J. Marton // *Nature reviews Drug discovery*. – 2007. – T. 6. – № 5. – C. 373-390.
66. Casero R. A. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities / R. A. Casero, T. M. Stewart, A. E. Pegg // *Nature Reviews Cancer*. – 2018. – T. 18. – № 11. – C. 681-695.
67. Chakraborty J. Gain of cellular adaptation due to prolonged p53 impairment leads to functional switchover from p53 to p73 during DNA damage in acute myeloid leukemia cells / J. Chakraborty, S. Banerjee, P. Ray, D. M. S. Hossain, S. Bhattacharyya, A. Adhikary, S. Chattopadhyay, T. Das, G. Sa // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – T. 285. – № 43. – C. 33104-33112.

68. Chan G. PI3K-dependent upregulation of Mcl-1 by human cytomegalovirus is mediated by epidermal growth factor receptor and inhibits apoptosis in short-lived monocytes / G. Chan, M. T. Nogalski, G. L. Bentz, M. S. Smith, A. Parmater, A. D. Yurochko // *The Journal of Immunology*. – 2010. – T. 184. – № 6. – C. 3213-3222.
69. Chan G. Human cytomegalovirus stimulates monocyte-to-macrophage differentiation via the temporal regulation of caspase 3 / G. Chan, M. T. Nogalski, A. D. Yurochko // *Journal of virology*. – 2012. – T. 86. – № 19. – C. 10714-10723.
70. Chanput W. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach / W. Chanput, J. J. Mes, H. J. Wichers // *International immunopharmacology*. – 2014. – T. 23. – № 1. – C. 37-45.
71. Cheeran M. C. J. Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways / M. C. J. Cheeran, S. Hu, H. T. Ni, W. Sheng, J. M. Palmquist, P. K. Peterson, J. R. Lokensgard // *Journal of neuroscience research*. – 2005. – T. 82. – № 6. – C. 839-850.
72. Chen H. P. Human cytomegalovirus preferentially infects the neoplastic epithelium of colorectal cancer: a quantitative and histological analysis / H. P. Chen, J. K. Jiang, C. Y. Chen, T. Y. Chou, Y. C. Chen, Y. T. Chang, S. F. Lin, C. H. Chan, C. Y. Yang, C. H. Lin, J. K. Lin, W. L. Cho, Y. J. Chan // *Journal of clinical virology*. – 2012. – T. 54. – № 3. – C. 240-244.
73. Chen H. Z. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control / H. Z. Chen, S. Y. Tsai, G. Leone // *Nature reviews cancer*. – 2009. – T. 9. – № 11. – C. 785-797.
74. Chillemi G. Structural evolution and dynamics of the p53 proteins / G. Chillemi, S. Kehrlöesser, F. Bernassola, A. Desideri, V. Dotsch, A. J. Levine, G. Melino // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2017. – T. 7. – № 4. – C. a028308.
75. Chung J. Y. The expression of phospho-AKT, phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma / J. Y. Chung, S. M. Hong, B. Y. Choi, H. Cho,

- E. Yu, S. M. Hewitt // *Clinical cancer research*. – 2009. – T. 15. – № 2. – C. 660-667.
76. Cobbs C. S. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma / C. S. Cobbs, L. Harkins, M. Samanta, G. Y. Gillespie, S. Bharara, P. H. King, L. B. Nabors, C. G. Cobbs, W. J. Britt // *Cancer research*. – 2002. – T. 62. – № 12. – C. 3347-3350.
 77. Cobbs C. S. Methods for the detection of cytomegalovirus in glioblastoma cells and tissues / C. S. Cobbs, L. Matlaf, L. E. Harkins // *Human Cytomegaloviruses*. – Humana Press, Totowa, NJ, 2014. – C. 165-196.
 78. Cojohari O. Human cytomegalovirus induces an atypical activation of Akt to stimulate the survival of short-lived monocytes / O. Cojohari, M. A. Peppenelli, G. C. Chan // *Journal of virology*. – 2016. – T. 90. – № 14. – C. 6443-6452.
 79. Collins-McMillen D. Molecular determinants and the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation / D. Collins-McMillen, J. Buehler, M. Peppenelli, F. Goodrum // *Viruses*. – 2018. – T. 10. – № 8. – C. 444.
 80. Collins-McMillen D. HCMV Infection and Apoptosis: How Do Monocytes Survive HCMV Infection? / D. Collins-McMillen, L. Chesnokova, B. J. Lee, H. L. Fulkerson, R. Brooks, B. S. Mosher, A. D. Yurochko // *Viruses*. – 2018. – T. 10. – № 10. – C. 533.
 81. Collins-McMillen D. Human cytomegalovirus promotes survival of infected monocytes via a distinct temporal regulation of cellular Bcl-2 family proteins / D. Collins-McMillen, J. H. Kim, M. T. Nogalski, E. V. Stevenson, G. C. Chan, J. R. Caskey, S. J. Cieply, A. D. Yurochko // *Journal of virology*. – 2016. – T. 90. – № 5. – C. 2356-2371.
 82. Conforti F. Regulation of p73 activity by post-translational modifications / F. Conforti, A. E. Sayan, R. Sreekumar, B. S. Sayan // *Cell death & disease*. – 2012. – T. 3. – № 3. – C. e285.
 83. Corti F. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in biliary tract cancers: A review of current evidences and future perspectives / F. Corti, F. Nichetti, A. Raimondi, M. Niger, N. Prinzi, M. Torchio, E. Tamborini, F. Perrone, G. Pruneri,

- M. Di Bartolomeo, F. de Braud, S. Pusceddu // *Cancer treatment reviews*. – 2019. – T. 72. – C. 45-55.
84. Curigliano G. Safety and tolerability of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitors in oncology / G. Curigliano, R. R. Shah // *Drug safety*. – 2019. – T. 42. – № 2. – C. 247-262.
 85. Czabotar P. E. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy / P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J. M. Adams // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2014. – T. 15. – № 1. – C. 49-63.
 86. Daglioglu C. Cascade therapy with doxorubicin and survivin-targeted tailored nanoparticles: An effective alternative for sensitization of cancer cells to chemotherapy / C. Daglioglu, F. N. Kaci // *International journal of pharmaceutics*. – 2019. – T. 561. – C. 74-81.
 87. Daley-Bauer L. P. Cytomegalovirus hijacks CX3CR1hi patrolling monocytes as immune-privileged vehicles for dissemination in mice / L. P. Daley-Bauer, L. J. Roback, G. M. Wynn, E. S. Mocarski // *Cell host & microbe*. – 2014. – T. 15. – № 3. – C. 351-362.
 88. Damiani E. Polyamines and cancer / E. Damiani, H. M. Wallace // *Polyamines*. – Humana Press, New York, NY, 2018. – C. 469-488.
 89. De Clercq E. Approved antiviral drugs over the past 50 years / E. De Clercq, G. Li // *Clinical microbiology reviews*. – 2016. – T. 29. – № 3. – C. 695-747.
 90. Del Moral-Hernandez O. Multiple infections by EBV, HCMV and *Helicobacter pylori* are highly frequent in patients with chronic gastritis and gastric cancer from Southwest Mexico: An observational study / O. Del Moral-Hernandez, C. A. Castanon-Sanchez, S. Reyes-Navarrete, D. N. Martinez-Carrillo, R. Betancourt-Linares, H. Jimenez-Wences, S. de la Pena, A. Roman-Roman, D. Hernandez-Sotelo, G. Fernandez-Tilapa // *Medicine*. – 2019. – T. 98. – № 3. – C. e14124.
 91. Denechaud P. D. E2F1, a novel regulator of metabolism / P. D. Denechaud, L. Fajas, A. Giralt // *Frontiers in endocrinology*. – 2017. – T. 8. – C. 311.

92. Dubrez L. Regulation of E2F1 transcription factor by ubiquitin conjugation / L. Dubrez // International journal of molecular sciences. – 2017. – T. 18. – № 10. – C. 2188.
93. Dupont L. Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem / L. Dupont, M. B. Reeves // Reviews in medical virology. – 2016. – T. 26. – № 2. – C. 75-89.
94. Dziurzynski K. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma / K. Dziurzynski, S. M. Chang, A. B. Heimberger, R. F. Kalejta, S. R. McGregor Dallas, M. Smit, L. Soroceanu, C. S. Cobbs // Neuro-oncology. – 2012. – T. 14. – № 3. – C. 246-255.
95. Eifler M. PUL21a-Cyclin A2 interaction is required to protect human cytomegalovirus-infected cells from the deleterious consequences of mitotic entry / M. Eifler, R. Uecker, H. Weisbach, B. Bogdanow, E. Richter, L. Konig, Barbara Vetter, T. Lenac-Rovis, S. Jonjic, H. Neitzel, C. Hagemeier, L. Wiebusch // PLoS pathogens. – 2014. – T. 10. – № 11. – C. e1004514.
96. El Helou G. Letermovir for the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients: an evidence-based review / G. El Helou, R. R. Razonable // Infection and Drug Resistance. – 2019. – T. 12. – C. 1481-1491.
97. El-Awady R. A. Epigenetics and miRNA as predictive markers and targets for lung cancer chemotherapy / R. A. El-Awady, F. Hersi, H. Al-Tunaiji, E. M. Saleh, A. H. A. Abdel-Wahab, A. Al Homssi, M. Suhail, A. El-Serafi, T. Al-Tel // Cancer biology & therapy. – 2015. – T. 16. – № 7. – C. 1056-1070.
98. Elder E. Monocytes latently infected with human cytomegalovirus evade neutrophil killing / E. Elder, B. Krishna, J. Williamson, Y. Aslam, N. Farahi, A. Wood, V. Romashova, K. Roche, E. Murphy, E. Chilvers, P. J. Lehner, J. Sinclair, E. Poole // IScience. – 2019. – T. 12. – C. 13-26.
99. Engelmann D. E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B / D. Engelmann, D. Mayoli-Nussle, C. Mayrhofer, K. Furst, V. Alla, A. Stoll, A. Spitschak, K.

- Abshagen, B. Vollmar, S. Ran, B. M. Putzer // *Journal of molecular cell biology*. – 2013. – T. 5. – № 6. – C. 391-403.
100. Engelmann D. Emerging from the shade of p53 mutants: N-terminally truncated variants of the p53 family in EMT signaling and cancer progression / D. Engelmann, B. M. Puetzer // *Sci. Signal.* – 2014. – T. 7. – № 345. – C. re9-re9.
 101. Engelmann D. Translating DNA damage into cancer cell death—a roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance / D. Engelmann, B. M. Putzer // *Drug Resistance Updates.* – 2010. – T. 13. – № 4-5. – C. 119-131.
 102. Ertosun M. G. E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling / M. G. Ertosun, F. Z. Hapil, O. O. Nidai // *Cytokine & growth factor reviews.* – 2016. – T. 31. – C. 17-25.
 103. Ewald P. W. The scope of viral causation of human cancers: interpreting virus density from an evolutionary perspective / P. W. Ewald, H. A. Swain Ewald // *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* – 2019. – T. 374. – № 1773. – C. 20180304.
 104. Eymin B. Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma / B. Eymin, S. Gazzeri, C. Brambilla, E. Brambilla // *Oncogene.* – 2001. – T. 20. – № 14. – C. 1678-1687.
 105. Fliss P. M. Prevention of cellular suicide by cytomegaloviruses / P. M. Fliss W. Brune // *Viruses.* – 2012. – T. 4. – № 10. – C. 1928-1949.
 106. Forbes S. A. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution / S. A. Forbes, D. Beare, H. Boutselakis, S. Bamford, N. Bindal, J. Tate, C. G. Cole, S. Ward, E. Dawson, L. Ponting, R. Stefancsik, B. Harsha, C. Y. Kok, M. Jia, H. Jubbs, Z. Sondka, S. Thompson, T. De, P. J. Campbell // *Nucleic acids research* – 2016. – T. 45. – № D1. – C. D777-D783.
 107. Francis S. S. In utero cytomegalovirus infection and development of childhood acute lymphoblastic leukemia / S. S. Francis, A. D. Wallace, G. A. Wendt, L. Li, F. Liu, L. W. Riley, S. Kogan, K. M. Walsh, A. J. de Smith, G. V. Dahl, X. Ma,

- E. Delwart, C. Metayer, J. L. Wiemels // *Blood*. – 2017. – T. 129. – № 12. – C. 1680-1684.
108. Frantzeskaki F. G. Cytomegalovirus reactivation in a general, nonimmunosuppressed intensive care unit population: incidence, risk factors, associations with organ dysfunction, and inflammatory biomarkers / F. G. Frantzeskaki, E. S. Karampi, C. Kottaridi, M. Alepaki, C. Routsis, M. Tzanela, D. A. Vassiliadi, E. Douka, S. Tsaousi, V. Gennimata, I. Ilias, N. Nikitas, A. Armaganidis, P. Karakitsos, V. Papaevangelou, I. Dimopoulou // *Journal of critical care*. – 2015. – T. 30. – № 2. – C. 276-281.
 109. Galluzzi L. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K.-M. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. Maria Fimia, S. Fulda, A.J. Garcia-Saez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jaattela, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S.W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. Lopez-Otin, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J.C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkentin, U. M.

- Moll, C. Munoz-Pinedo, S. Nagata, Gabriel Nunez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H.M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M.P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W.G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. V. Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E.F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, G. Kroemer // *Cell Death & Differentiation*. – 2018. – T. 25. – № 3. – C. 486-541.
110. Gebel J. Control mechanisms in germ cells mediated by p53 family proteins / J. Gebel, M. Tuppi, K. Krauskopf, D. Coutandin, S. Pitzius, S. Kehrloesser, C. Osterburg, V. Dotsch, // *J Cell Sci*. – 2017. – T. 130. – № 16. – C. 2663-2671.
 111. Gibson W. Compartmentalization of spermine and spermidine in the herpes simplex virion / W. Gibson, B. Roizman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1971. – T. 68. – № 11. – C. 2818-2821.
 112. Gibson W. D, L-alpha-difluoromethylornithine inhibits human cytomegalovirus replication / W. Gibson, R. Van Breemen, A. Fields, R. LaFemina, A. Irmieri // *Journal of virology*. – 1984. – T. 50. – № 1. – C. 145-154.
 113. Goldstein D. A. Biphasic stimulation of polyamine biosynthesis in primary mouse kidney cells by infection with polyoma virus: uncoupling from DNA and rRNA synthesis / D. A. Goldstein, O. Heby, L. J. Marton // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1976. – T. 73. – № 11. – C. 4022-4026.
 114. Goodrum F. Human cytomegalovirus latency: approaching the Gordian knot / F. Goodrum // *Annual review of virology*. – 2016. – T. 3. – C. 333-357.
 115. Goodrum F. Human cytomegalovirus persistence / F. Goodrum, K. Caviness, P. Zagallo // *Cellular microbiology*. – 2012. – T. 14. – № 5. – C. 644-655.
 116. Goodrum F. D. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency / F. D. Goodrum, C.

- T. Jordan, K. High, T. Shenk // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99. – № 25. – C. 16255-16260.
117. Goodrum F. Differential outcomes of human cytomegalovirus infection in primitive hematopoietic cell subpopulations / F. Goodrum, C. T. Jordan, S. S. Terhune, K. High, T. Shenk // Blood. – 2004. – T. 104. – № 3. – C. 687-695.
 118. Goodrum F. A single-cell approach to the elusive latent human cytomegalovirus transcriptome / F. Goodrum, S. McWeeney // mBio. – 2018. – T. 9. – № 3. – C. e01001-18.
 119. Goodrum F. Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro / F. Goodrum, M. Reeves, J. Sinclair, K. High, T. Shenk // Blood. – 2007. – T. 110. – № 3. – C. 937-945.
 120. Greco A. S-adenosyl methionine decarboxylase activity is required for the outcome of herpes simplex virus type 1 infection and represents a new potential therapeutic target / A. Greco, A. Calle, F. Morfin, D. Thouvenot, M. Cayre, K. Kindbeiter, L. Martin, O. Levillain, J. J. Diaz // The FASEB journal. – 2005. – T. 19. – № 9. – C. 1128-1130.
 121. Griffiths P. Desirability and feasibility of a vaccine against cytomegalovirus / P. Griffiths, S. Plotkin, E. Mocarski, R. Pass, M. Schleiss, P. Krause, S. Bialek // Vaccine. – 2013. – T. 31. – C. B197-B203.
 122. Gul A. A combination of the PI3K pathway inhibitor plus cell cycle pathway inhibitor to combat endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer: a genomic algorithm-based treatment approach / A. Gul, B. Leyland-Jones, N. Dey, P. De // American journal of cancer research. – 2018. – T. 8. – № 12. – C. 2359-2376.
 123. Guri Y. mTORC2 promotes tumorigenesis via lipid synthesis / Y. Guri, M. Colombi, E. Dazert, S. K. Hindupur, J. Roszik, S. Moes, P. Jenoe, M. H. Heim, I. Riezman, H. Riezman, M. N. Hall // Cancer cell. – 2017. – T. 32. – № 6. – C. 807-823. e12.
 124. Hadrup S. R. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of

- dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly / S. R. Hadrup, J. Strindhall, T. Kollgaard, T. Seremet, B. Johansson, G. Pawelec, P. thor Straten, A. Wikby // *The Journal of Immunology*. – 2006. – T. 176. – № 4. – C. 2645-2653.
125. Harkins L. E. Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium / L. E. Harkins, L. A. Matlaf, L. Soroceanu, K. Klemm, W. J. Britt, W. Wang, K. I. Bland, C. S. Cobbs // *Herpesviridae*. – 2010. – T. 1. – № 1. – C. 8.
 126. Harkins L. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer / L. Harkins, A. L. Volk, M. Samanta, I. Mikolaenko, W. J. Britt, K. I. Bland, C. S. Cobbs // *The Lancet*. – 2002. – T. 360. – № 9345. – C. 1557-1563.
 127. Herbein G. The human cytomegalovirus, from oncomodulation to oncogenesis / G. Herbein // *Viruses*. – 2018. – T. 10. – № 8. – C. 408.
 128. Herbein G. The oncogenic potential of human cytomegalovirus and breast cancer / G. Herbein, A. Kumar // *Frontiers in oncology*. – 2014. – T. 4. – C. 230.
 129. Herbein G. Histone deacetylases in viral infections / G. Herbein, D. Wendling // *Clin. Epigenet*. 1: 13–24. – 2010.
 130. Hesari M. Protective effect of paracetamol in doxorubicin-induced cardiotoxicity in ischemia/reperfused isolated rat heart / M. Hesari, D. Shackebaei, A. Asadmobini // *Anatolian journal of cardiology*. – 2018. – T. 19. – № 2. – C. 94-99.
 131. Hume A. J. Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin-dependent kinase function / A. J. Hume, J. S. Finkel, J. P. Kamil, D. M. Coen, M. R. Culbertson, R. F. Kalejta // *Science*. – 2008. – T. 320. – № 5877. – C. 797-799.
 132. Hume A. J. Regulation of the retinoblastoma proteins by the human herpesviruses / A. J. Hume, R. F. Kalejta // *Cell division*. – 2009. – T. 4. – № 1. – C. 1.

133. Hussain T. Polyamines: therapeutic perspectives in oxidative stress and inflammatory diseases / T. Hussain, B. Tan, W. Ren, N. Rahu, R. Dad, D. H. Kalhoro, Y. Yin // *Amino Acids*. – 2017. – T. 49. – № 9. – C. 1457-1468.
134. Igarashi K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells / K. Igarashi, K. Kashiwagi // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2019. – T. 107. – C. 104-115.
135. Ingerslev K. The prevalence of EBV and CMV DNA in epithelial ovarian cancer / K. Ingerslev, E. Hogdall, W. Skovrider-Ruminski, T. H. Schnack, M. Lidang, C. Hogdall, J. Blaakaer // *Infectious agents and cancer*. – 2019. – T. 14. – № 1. – C. 7.
136. Itahana Y. Emerging roles of p53 family members in glucose metabolism / Y. Itahana, K. Itahana // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – T. 19. – № 3. – C. 776.
137. Iwahori S. Human cytomegalovirus-encoded viral cyclin-dependent kinase (v-CDK) UL97 phosphorylates and inactivates the retinoblastoma protein-related p107 and p130 proteins / S. Iwahori, A. C. Umana, H. R. VanDeusen, R. F. Kalejta // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – T. 292. – № 16. – C. 6583-6599.
138. Jackson J. There is always another way! cytomegalovirus' multifaceted dissemination schemes / J. Jackson, T. Sparer // *Viruses*. – 2018. – T. 10. – № 7. – C. 383.
139. Jancalek R. The role of the TP73 gene and its transcripts in neuro-oncology / R. Jancalek // *British journal of neurosurgery*. – 2014. – T. 28. – № 5. – C. 598-605.
140. Jarvis M. A. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages / M. A. Jarvis, J. A. Nelson // *Current opinion in microbiology*. – 2002. – T. 5. – № 4. – C. 403-407.
141. Jault F. M. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest / F. M. Jault, J. M. Jault, F. Ruchti, E. A. Fortunato, C. Clark, J. Corbeil, D. D. Richman, D. H. Spector // *Journal of virology*. – 1995. – T. 69. – № 11. – C. 6697-6704.

142. Jenkins C. A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection / C. Jenkins, A. Abendroth, B. Slobedman // *Journal of virology*. – 2004. – T. 78. – № 3. – C. 1440-1447.
143. Jhanwar-Uniya M. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship / M. Jhanwar-Uniya, J. V. Wainwright, A. L. Mohan, M. E. Tobias, R. Murali, C. D. Gandhi, M. H. Schmidt // *Advances in biological regulation*. – 2019. – T. 72. – C. 51-62
144. Jin J. Latent infection of human cytomegalovirus is associated with the development of gastric cancer / J. Jin, C. Hu, P. Wang, J. Chen, T. Wu, W. Chen, L. Ye, G. Zhu, L. Zhang, X. Xue, X. Shen // *Oncology letters*. – 2014. – T. 8. – № 2. – C. 898-904.
145. John K. GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at mitochondria / K. John, V. Alla, C. Meier, B. M. Putzer // *Cell death and differentiation*. – 2012. – T. 19. – № 3. – C. 552.
146. Johnson R. A. Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling / R. A. Johnson, X. Wang, X. L. Ma, S. M. Huong, E. S. Huang // *Journal of virology*. – 2001. – T. 75. – № 13. – C. 6022-6032.
147. Julien O. Caspases and their substrates / O. Julien, J. A. Wells // *Cell death and differentiation*. – 2017. – T. 24. – № 8. – C. 1380.
148. Kalivendi S. V. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium / S. V. Kalivendi, E. A. Konorev, S. Cunningham, S. K. Vanamala, E. H. Kaji, J. Joseph, B. Kalyanaraman // *Biochemical Journal*. – 2005. – T. 389. – № 2. – C. 527-539.
149. Kalkavan H. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business / H. Kalkavan, D. R. Green // *Cell death and differentiation*. – 2018. – T. 25. – № 1. – C. 46-55.
150. Kasim V. Synergistic cooperation of MDM2 and E2F1 contributes to TAp73 transcriptional activity / V. Kasim, C. Huang, J. Zhang, H. Jia, Y. Wang, L. Yang,

- M. Miyagishi, S. Wu // Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – T. 449. – № 3. – C. 319-326.
151. Keating R. mTOR regulation of lymphoid cells in immunity to pathogens / R. Keating, M. A. McGargill // Frontiers in immunology. – 2016. – T. 7. – C. 180.
 152. Keyes L. R. Correction: HCMV Protein LUNA Is Required for Viral Reactivation from Latently Infected Primary CD14+ Cells / L. R. Keyes, D. Hargett, M. Soland, M. G. Bego, C. C. Rossetto, G. Almeida-Porada, S. S. Jeor // PloS one. – 2013. – T. 8. – № 10.
 153. Kim J. H. Human cytomegalovirus requires epidermal growth factor receptor signaling to enter and initiate the early steps in the establishment of latency in CD34+ human progenitor cells / J. H. Kim, D. Collins-McMillen, J. C. Buehler, F. D. Goodrum, A. D. Yurochko // Journal of virology. – 2017. – T. 91. – № 5. – C. e01206-16.
 154. Knoll S. E2F1 induces miR-224/452 expression to drive EMT through TXNIP downregulation / S. Knoll, K. Furst, B. Kowtharapu, U. Schmitz, S. Marquardt, O. Wolkenhauer, H. Martin, B. M. Putzer // EMBO reports. – 2014. – T. 15. – № 12. – C. 1315-1329.
 155. Konig P. Dynamic regulatory interaction between cytomegalovirus major tegument protein pp65 and protein kinase pUL97 in intracellular compartments, dense bodies and virions / P. Konig, N. Buscher, M. Steingruber, E. Socher, H. Sticht, S. Tenzer, B. Plachter, M. Marschall // Journal of General Virology. – 2017. – T. 98. – № 11. – C. 2850-2863.
 156. Kotton C. N. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation / C. N., Kotton, D., Kumar, A. M., Caliendo, A., Asberg, S., Chou, D. R., Snyderman, U. Allen, A. Humar // Transplantation. – 2010. – T. 89. – № 7. – C. 779-795.
 157. Kotton C. N. The third international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation / C. N. Kotton, D. Kumar, A. M. Caliendo, S. Huprikar, S. Chou, L. Danziger-Isakov, A. Humar // Transplantation. – 2018. – T. 102. – № 6. – C. 900-931.

158. Koval V. S. DNA sequence-specific ligands. XVII. Synthesis, spectral properties, virological and biochemical studies of fluorescent dimeric bisbenzimidazoles DBA (n) / V. S. Koval, A. F. Arutyunyan, V. L. Salyanov, R. R. Klimova, A. A. Kushch, E. Y. Rybalkina, O. Y. Susova, A. L. Zhuze // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2018. – T. 26. – № 9. – C. 2302-2309.
159. Kovesdi I. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation / I. Kovesdi, R. Reichel, J. R. Nevins // *Cell*. – 1986. – T. 45. – № 2. – C. 219-228.
160. Kuriakose R. K. Potential therapeutic strategies for hypertension-exacerbated cardiotoxicity of anticancer drugs / R. K. Kuriakose, R. C. Kukreja, L. Xi // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2016. – T. 2016.
161. Kuss-Duerkop S. K. Influenza virus differentially activates mTORC1 and mTORC2 signaling to maximize late stage replication / S. K. Kuss-Duerkop, J. Wang, I. Mena, K. White, G. Metreveli, R. Sakthivel, M. A. Mata, R. Munoz-Moreno, X. Chen, F. Krammer, M. S. Diamond, Z. J. Chen, A. Garcia-Sastre, B. M. A. Fontoura // *PLoS pathogens*. – 2017. – T. 13. – № 9. – C. e1006635.
162. Lee J. S. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors / J. S. Lee, S. H. Leem, S. Y. Lee, S. C. Kim, E. S. Park, S. B. Kim, S. B. Kim, S. K. Kim, Y. J. Kim, W. J. Kim, I. S. Chu // *Journal of clinical oncology*. – 2010. – T. 28. – № 16. – C. 2660-2667.
163. Leila Z. Detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in gastric cancers in Kerman, Iran / Z. Leila, S. A. Arabzadeh, R. M. Afshar, A. A. Afshar, H. R. Mollaei // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2016. – T. 17. – № 5. – C. 2423-2428.
164. Leng S. X. Recent advances in CMV tropism, latency, and diagnosis during aging / S. X. Leng, J. Kamil, J. G. Purdy, N. A. Lemmermann, M. J. Reddehase, F. D. Goodrum // *Geroscience*. – 2017. – T. 39. – № 3. – C. 251-259.
165. Lepiller Q. Increased HCMV seroprevalence in patients with hepatocellular carcinoma / Q. Lepiller, M. K. Tripathy, V. Di Martino, B. Kantelip, G. Herbein // *Virology journal*. – 2011. – T. 8. – № 1. – C. 485.

166. Levine A. J. The p53 family: guardians of maternal reproduction / A. J. Levine, R. Tomasini, F. D. McKeon, T. W. Mak, G. Melino // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2011. – T. 12. – № 4. – C. 259-265.
167. Li D. L. Doxorubicin blocks cardiomyocyte autophagic flux by inhibiting lysosome acidification / D. L. Li, Z. V. Wang, G. Ding, W. Tan, X. Luo, A. Criollo, M. Xie, N. Jiang, H. May, V. Kyrychenko, J. W. Schneider, T. G. Gillette, J. A. Hill // *Circulation*. – 2016. – T. 133. – № 17. – C. 1668-1687.
168. Lichtner M. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients / M. Lichtner, P. Cicconi, S. Vita, A. Cozzi-Lepri, M. Galli, S. Lo Caputo, A. Saracino, A. De Luca, M. Moioli, F. Maggiolo, G. Marchetti, V. Vullo, A. d'Arminio Monforte, M. Moroni, G. Angarano, A. Antinori, O. Armignacco, F. Castelli, R. Cauda, G. Di Perri, M. Galli, R. Iardino, G. Ippolito, A. Lazzarin, C. F. Perno, F. von Schloesser, P. Viale, A. Antinori, A. Castagna, F. Ceccherini-Silberstein, A. Cozzi-Lepri, E. Girardi, C. Mussini, M. Puoti, M. Andreoni, A. Ammassari, A. Antinori, C. Balotta, P. Bonfanti, S. Bonora, M. Borderi, M. Capobianchi, A. Castagna, F. Ceccherini-Silberstein, A. Cingolani, P. Cinque, A. Cozzi-Lepri, A. Di Biagio, E. Girardi, N. Gianotti, A. Gori, G. Guaraldi, G. Lapadula, M. Lichtner, S. Lo Caputo, G. Madeddu, F. Maggiolo, S. Marcotullio, L. Monno, C. Mussini, M. Puoti, E. Quiros Roldan, S. Rusconi, A. Cozzi-Lepri, P. Cicconi, I. Fanti, T. Formenti, L. Galli, P. Lorenzini, A. Giacometti, A. Costantini, G. Angarano, L. Monno, C. Carrisa, F. Maggiolo, C. Suardi, P. Viale, E. Vanino, G. Verucchi, F. Castelli, E. Quiros Roldan, C. Minardi, T. Quirino, C. Abeli, P. E. Manconi, P. Piano, J. Vecchiet, K. Falasca, L. Sighinolfi, D. Segala, F. Mazzotta, S. Lo Caputo, G. Cassola, G. Viscoli, A. Alessandrini, R. Piscopo, G. Mazzeo, C. Mastroianni, V. Belvisi, P. Bonfanti, I. Caramma, A. P. Castelli, M. Galli, A. Lazzarin, G. Rizzardini, M. Puoti, A. d'Arminio Monforte, A. L. Ridolfo, R. Piolini, A. Castagna, S. Salpietro, L. Carenzi, M. C. Moioli, P. Cicconi, G. Marchetti, C. Mussini, C. Puzzolante, A. Gori, G. Lapadula, N. Abrescia, A. Chirianni, M. G. Guida, M. Gargiulo, F. Baldelli, D. Francisci, G.

- Parruti, T. Ursini, G. Magnani, M. A. Ursitti, R. Cauda, M. Andreoni, A. Antinori, V. Vullo, A. Cingolani, A. d'Avino, A. Ammassari, L. Gallo, E. Nicastri, R. Acinapura, M. Capozzi, R. Libertone, G. Tebano, A. Cattelan, M. S. Mura, G. Madeddu, P. Caramello, G. Di Perri, G. C. Orofino, S. Bonora, M. Sciandra, G. Pellizzer, V. Manfrin // *The Journal of infectious diseases*. – 2014. – T. 211. – № 2. – C. 178-186.
169. Lin Q. Knocking down FAM83B inhibits endometrial cancer cell proliferation and metastasis by silencing the PI3K/AKT/mTOR pathway / Q. Lin, H. Chen, M. Zhang, H. Xiong, Q. Jiang // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – T. 115. – C. 108939.
 170. Lontos M. Modulation of the E2F1-driven cancer cell fate by the DNA damage response machinery and potential novel E2F1 targets in osteosarcomas / M. Lontos, K. Niforou, G. Velimezi, K. Vougas, K. Evangelou, K. Apostolopoulou, R. Vrtel, A. Damalas, P. Kontovazenitis, A. Kotsinas, V. Zoumpourlis, G. Th. Tsangaris. C. Kittas, D. Ginsberg, T. D. Halazonetis, J. Bartek, V. G. Gorgoulis // *The American journal of pathology*. – 2009. – T. 175. – № 1. – C. 376-391.
 171. Lischka P. In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246 / P. Lischka, G. Hewlett, T. Wunberg, J. Baumeister, D. Paulsen, T. Goldner, H. Ruebsamen-Schaeff, H. Zimmermann // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – T. 54. – № 3. – C. 1290-1297.
 172. Liu C. H. The First Reported Case of Cytomegalovirus Gastritis in a Patient With End-Stage Renal Disease / C. H. Liu, A. H. Yang, S. M. Ou, D. C. Tarng // *The American journal of the medical sciences*. – 2018. – T. 355. – № 6. – C. 607-609.
 173. Liu K. p73 expression is associated with cellular chemosensitivity in human non-small cell lung cancer cell lines / K. Liu, X. Zhuang, Z. Mai // *Oncology letters*. – 2013. – T. 5. – № 2. – C. 583-587.
 174. Liu X. Epigenetic control of cytomegalovirus latency and reactivation / X. F. Liu, X. Wang, S. Yan, Z. Zhang, M. Abecassis, M. Hummel // *Viruses*. – 2013. – T. 5. – № 5. – C. 1325-1345.

175. Liu Y. The human cytomegalovirus UL35 gene encodes two proteins with different functions / Y. Liu, B. J. Biegel // *Journal of virology*. – 2002. – T. 76. – № 5. – C. 2460-2468.
176. Ljungman P. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients / P. Ljungman, M. Hakki, M. Boeckh // *Hematology/oncology clinics of North America*. – 2011. – T. 25. – № 1. – C. 151.
177. Logotheti S. Functions, divergence and clinical value of TAp73 isoforms in cancer / S. Logotheti, A. Pavlopoulou, S. Galtsidis, B. Vojtesek, V. Zoumpourlis // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2013. – T. 32. – № 3-4. – C. 511-534.
178. Logotheti S. p73-Governed miRNA Networks: Translating Bioinformatics Approaches to Therapeutic Solutions for Cancer Metastasis / S. Logotheti, S. Marquardt, B. M. Putzer // *Computational Biology of Non-Coding RNA*. – Humana Press, New York, NY, 2019. – C. 33-52.
179. Luo X. H. The impact of inflationary cytomegalovirus-specific memory T cells on anti-tumour immune responses in patients with cancer / X. H. Luo, Q. Meng, M. Rao, Z. Liu, G. Paraschoudi, E. Dodoo, M. Maeurer // *Immunology*. – 2018. – T. 155. – № 3. – C. 294-308.
180. Ma Y. Human CMV transcripts: an overview / Y. Ma, N. Wang, M. Li, S. Gao, L. Wang, B. Zheng, Y. Qi, Q. Ruan // *Future microbiology*. – 2012. – T. 7. – № 5. – C. 577-593.
181. Madeo F. Spermidine in health and disease / F. Madeo, T. Eisenberg, F. Pietrocola, G. Kroemer // *Science*. – 2018. – T. 359. – № 6374. – C. eaan2788.
182. Malouf C. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia / C. Malouf, K. Ottersbach // *Cellular and molecular life sciences*. – 2018. – T. 75. – № 3. – C. 417-446.
183. Mandal S. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells / S. Mandal, A. Mandal, H. E. Johansson, A. V. Orjalo, M. H. Park // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – T. 110. – № 6. – C. 2169-2174.

184. Manicklal S. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus / S. Manicklal, V. C. Emery, T. Lazzarotto, S. B. Boppana, R. K. Gupta // *Clinical microbiology reviews*. – 2013. – T. 26. – № 1. – C. 86-102.
185. Manning B. D. AKT/PKB signaling: navigating the network / B. D. Manning, A. Toker // *Cell*. – 2017. – T. 169. – № 3. – C. 381-405.
186. Marinello J. Anthracyclines as topoisomerase II poisons: From early studies to new perspectives / J. Marinello, M. Delcuratolo, G. Capranico // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – T. 19. – № 11. – C. 3480.
187. Marques M. M. The Trp73 mutant mice: a ciliopathy model that uncouples Ciliogenesis from Planar Cell Polarity / M. M. Marques, J. Villoch-Fernandez, L. Maeso-Alonso, S. Fuertes-Alvarez, M. C. Marin // *Frontiers in Genetics*. – 2019. – T. 10. – C. 154.
188. Martelli A. M. Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment / A. M. Martelli, F. Chiarini, C. Evangelisti, A. Cappellini, F. Buontempo, D. Bressanin, M. Fini, J. A. McCubrey // *Oncotarget*. – 2012. – T. 3. – № 4. – C. 371-394.
189. Maschkowitz G. Interaction of human cytomegalovirus tegument proteins ppUL35 and ppUL35A with sorting nexin 5 regulates glycoprotein B (gpUL55) localization / G. Maschkowitz, S. Gartner, H. Hofmann-Winkler, H. Fickenscher, M. Winkler // *Journal of virology*. – 2018. – T. 92. – № 9. – C. e00013-18.
190. McCormick A. L. Mitochondrial cell death suppressors carried by human and murine cytomegalovirus confer resistance to proteasome inhibitor-induced apoptosis / A. L. McCormick, C. D. Meiering, G. B. Smith, E. S. Mocarski // *Journal of virology*. – 2005. – T. 79. – № 19. – C. 12205-12217.
191. McCormick A. L. The human cytomegalovirus UL36 gene controls caspase-dependent and-independent cell death programs activated by infection of monocytes differentiating to macrophages / A. L. McCormick, L. Roback, D. Livingston-Rosanoff, C. S. Clair // *Journal of virology*. – 2010. – T. 84. – № 10. – C. 5108-5123.

192. McIlwain D. R. Caspase functions in cell death and disease / D. McIlwain R., T. Berger, T. W. Mak // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2013. – T. 5. – № 4. – C. a008656.
193. McKinney C. Global reprogramming of the cellular translational landscape facilitates cytomegalovirus replication / C. McKinney, J. Zavadil, C. Bianco, L. Shiflett, S. Brown, I. Mohr // Cell reports. – 2014. – T. 6. – № 1. – C. 9-17.
194. Meier C. Association of RHAMM with E2F1 promotes tumour cell extravasation by transcriptional up-regulation of fibronectin / C. Meier, A. Spitschak, K. Abshagen, S. Gupta, J. M. Mor, O. Wolkenhauer, J. Haier, B. Vollmar, V. Alla, B. M. Putzer // The Journal of pathology. – 2014. – T. 234. – № 3. – C. 351-364.
195. Minois N. Molecular Basis of the ‘Anti-Aging’ Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines-A Mini-Review / N. Minois // Gerontology. – 2014. – T. 60. – № 4. – C. 319-326.
196. Mirabilii S. Biological aspects of mtor in leukemia / S. Mirabilii, M. R. Ricciardi, M. Piedimonte, V. Gianfelici, M. P. Bianchi, A. Tafuri // International journal of molecular sciences. – 2018. – T. 19. – № 8. – C. 2396.
197. Mocarski E. S. Cytomegaloviruses, p 1960–2014 // Fields virology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. – 2013.
198. Moinard C. Polyamines: metabolism and implications in human diseases / C. Moinard, L. Cynober, J. P. de Bandt // Clinical nutrition. – 2005. – T. 24. – № 2. – C. 184-197.
199. Moldoveanu T. Many players in BCL-2 family affairs / T. Moldoveanu, A. V. Follis, R. W. Kriwacki, D. R. Green // Trends in biochemical sciences. – 2014. – T. 39. – № 3. – C. 101-111.
200. Moorman N. J. Human cytomegalovirus protein UL38 inhibits host cell stress responses by antagonizing the tuberous sclerosis protein complex / N. J. Moorman, I. M. Cristea, S. S. Terhune, M. P. Rout, B. T. Chait, T. Shenk // Cell host & microbe. – 2008. – T. 3. – № 4. – C. 253-262.
201. Mounce B. C. Inhibition of polyamine biosynthesis is a broad-spectrum strategy against RNA viruses / B. C. Mounce, T. Cesaro, G. Moratorio, P. J. Hooikaas, A.

- Yakovleva, S. W. Werneke, E. C. Smith, E. Z. Poirier, E. Simon-Loriere, M. Prot, C. Tamietti, S. Vitry, R. Volle, C. Khou, M. P. Frenkiel, A. Sakuntabhai, F. Delpeyroux, N. Pardigon, M. Flamand, G. Barba-Spaeth, M. Lafon, M. R. Denison, M. L. Albert, M. Vignuzzi // *Journal of virology*. – 2016. – T. 90. – № 21. – C. 9683-9692.
202. Mucke K. Human cytomegalovirus major immediate early 1 protein targets host chromosomes by docking to the acidic pocket on the nucleosome surface / K. Mucke, C. Paulus, K. Bernhardt, K. Gerrer, K. Schon, A. Fink, E. M. Sauer, A. Asbach-Nitzsche, T. Harwardt, B. Kieninger, W. Kremer, H. R. Kalbitzer, M. Nevels // *Journal of virology*. – 2014. – T. 88. – № 2. – C. 1228-1248.
203. Napoli M. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy / M. Napoli, E. R. Flores // *British journal of cancer*. – 2017. – T. 116. – № 2. – C. 149-155.
204. Nardacci R. Role of autophagy in HIV infection and pathogenesis / R. Nardacci, F. Ciccosanti, C. Marsella, G. Ippolito, M. Piacentini, G. M. Fimia // *Journal of internal medicine*. – 2017. – T. 281. – № 5. – C. 422-432.
205. Nehme Z. Control of viral infections by epigenetic-targeted therapy / Z. Nehme, S. Pasquereau, G. Herbein // *Clinical epigenetics*. – 2019. – T. 11. – № 1. – C. 55.
206. Nemajero A. Non-oncogenic roles of TAp73: from multiciliogenesis to metabolism / A. Nemajero, I. Amelio, J. Gebel, V. Dotsch, G. Melino, U. M. Moll // *Cell death and differentiation*. – 2018. – T. 25. – № 1. – C. 144-153.
207. Nikolaou M. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview / M. Nikolaou, A. Pavlopoulou, A. G. Georgakilas, E. Kyrodimos // *Clinical & experimental metastasis*. – 2018. – T. 35. – № 4. – C. 309-318.
208. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections / J. Nikolich-Zugich // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – T. 8. – № 7. – C. 512-522.
209. Nishimura M. Structural Aspects of Betaherpesvirus-Encoded Proteins / M. Nishimura, Y. Mori // *Human Herpesviruses*. – Springer, Singapore, 2018. – C. 227-249.

210. Nogalski M. T. The HCMV gH/gL/UL128-131 complex triggers the specific cellular activation required for efficient viral internalization into target monocytes / M. T. Nogalski, G. C. Chan, E. V. Stevenson, D. K. Collins-McMillen, A. D. Yurochko // *PLoS pathogens*. – 2013. – T. 9. – № 7. – C. e1003463.
211. Norris K. L. Cytomegalovirus proteins vMIA and m38. 5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins / K. L. Norris, R. J. Youle // *Journal of virology*. – 2008. – T. 82. – № 13. – C. 6232-6243.
212. Nowotarski S. L. Polyamines and cancer: implications for chemoprevention and chemotherapy / S. L. Nowotarski, P. M. Woster, Jr R. A. Casero // *Expert reviews in molecular medicine*. – 2013. – T. 15. – C. e3.
213. O'Connor C. M. Host microRNA regulation of human cytomegalovirus immediate early protein translation promotes viral latency / C. M. O'Connor, J. Vanicek, E. A. Murphy // *Journal of virology*. – 2014. – T. 88. – № 10. – C. 5524-5532.
214. Octavia Y. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies / Y. Octavia, C. G. Tocchetti, K. L. Gabrielson, S. Janssens, H. J. Crijns, A. L. Moens // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2012. – T. 52. – № 6. – C. 1213-1225.
215. O'Donnell J. S. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux / J. S. O'Donnell, D. Massi, M. W. Teng, M. Mandala // *Seminars in cancer biology*. – Academic Press, 2018. – T. 48. – C. 91-103.
216. Oliveira M. L. IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An update / M. L. Oliveira, P. Akkapeddi, D. Ribeiro, A. Melao, J. T. Barata // *Advances in biological regulation*. – 2019. – T. 71. – C. 88-96.
217. Pascual J. Role of mTOR inhibitors for the control of viral infection in solid organ transplant recipients / J. Pascual, A. Royuela, A. M. Fernandez, I. Herrero, J. F. Delgado, A. Sole, L. Guirado, T. Serrano, J. de la Torre-Cisneros, A. Moreno, E. Cordero, R. Gallego, C. Lumbreras, J. M. Aguado // *Transplant Infectious Disease*. – 2016. – T. 18. – № 6. – C. 819-831.

218. Patel M. Serine arginine protein kinase 1 (SRPK1): a moonlighting protein with theranostic ability in cancer prevention / M. Patel, M. Sachidanandan, M. Adnan // *Molecular biology reports*. – 2019. – T. 46. – № 1. – C. 1487-1497.
219. Patel V. G. Cardiovascular Complications Associated with Multiple Myeloma Therapies: Incidence, Pathophysiology, and Management / V. G. Patel, R. F. Cornell // *Current oncology reports*. – 2019. – T. 21. – № 4. – C. 29.
220. Patterson C. E. Human cytomegalovirus UL36 protein is dispensable for viral replication in cultured cells / C. E. Patterson, T. Shenk // *Journal of virology*. – 1999. – T. 73. – № 9. – C. 7126-7131.
221. Pegg A. E. Toxicity of polyamines and their metabolic products / A. E. Pegg // *Chemical research in toxicology*. – 2013. – T. 26. – № 12. – C. 1782-1800.
222. Peppenelli M. A. Human cytomegalovirus stimulates the synthesis of select Akt-dependent antiapoptotic proteins during viral entry to promote survival of infected monocytes / M. A. Peppenelli, K. C. Arend, O. Cojohari, N. J. Moorman, G. C. Chan // *Journal of virology*. – 2016. – T. 90. – № 6. – C. 3138-3147.
223. Pflaum J. p53 family and cellular stress responses in cancer / J. Pflaum, S. Schlosser, M. Muller // *Frontiers in oncology*. – 2014. – T. 4. – C. 285.
224. Poole E. The UL144 gene product of human cytomegalovirus activates NFκB via a TRAF6-dependent mechanism / E. Poole, C. A. King, J. H. Sinclair, A. Alcamì // *The EMBO journal*. – 2006. – T. 25. – № 18. – C. 4390-4399.
225. Poole E. Latency-associated viral interleukin-10 (IL-10) encoded by human cytomegalovirus modulates cellular IL-10 and CCL8 secretion during latent infection through changes in the cellular microRNA hsa-miR-92a / E. Poole, S. Avdic, J. Hodgkinson, S. Jackson, M. Wills, B. Slobedman, J. Sinclair // *Journal of virology*. – 2014. – T. 88. – № 24. – C. 13947-13955.
226. Poppy Roworth A. To live or let die—complexity within the E2F1 pathway / A. Poppy Roworth, F. Ghari, N. B. La Thangue // *Molecular & cellular oncology*. – 2015. – T. 2. – № 1. – C. e970480.
227. Qian Z. The human cytomegalovirus protein pUL38 suppresses endoplasmic reticulum stress-mediated cell death independently of its ability to induce

- mTORC1 activation / Z. Qian, B. Xuan, N. Gualberto, D. Yu // Journal of virology. – 2011. – T. 85. – № 17. – C. 9103-9113.
228. Rahbar A. Human cytomegalovirus infection levels in glioblastoma multiforme are of prognostic value for survival / A. Rahbar, A. Orrego, I. Peredo, M. Dzabic, N. Wolmer-Solberg, K. Straat, G. Stragliotto, C. Soderberg-Naucler // Journal of Clinical Virology. – 2013. – T. 57. – № 1. – C. 36-42.
 229. Ramani D. Aliphatic polyamines in physiology and diseases / D. Ramani, J. P. De Bandt, L. Cynober // Clinical nutrition. – 2014. – T. 33. – № 1. – C. 14-22.
 230. Ranganathan P. Significant association of multiple human cytomegalovirus genomic loci with glioblastoma multiforme samples / P. Ranganathan, P. A. Clark, J. S. Kuo, M. S. Salamat, R. F. Kalejta // Journal of virology. – 2012. – T. 86. – № 2. – C. 854-864.
 231. Reeves M. B. Analysis of latent viral gene expression in natural and experimental latency models of human cytomegalovirus and its correlation with histone modifications at a latent promoter / M. B. Reeves, J. H. Sinclair // Journal of General Virology. – 2010. – T. 91. – № 3. – C. 599-604.
 232. Reeves M. B. Circulating dendritic cells isolated from healthy seropositive donors are sites of human cytomegalovirus reactivation in vivo / M. B. Reeves, J. H. Sinclair // Journal of virology. – 2013. – T. 87. – № 19. – C. 10660-10667.
 233. Reinke P. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV)(re) activation and its impact on organ transplant patients / P. Reinke, S. Prosch, F. Kern, H. D. Volk // Transplant infectious disease. – 1999. – T. 1. – № 3. – C. 157-164.
 234. Riegler S. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus / S. Riegler, H. Hebart, H. Einsele, P. Brossart, G. Jahn, C. Sinzger // Journal of General Virology. – 2000. – T. 81. – № 2. – C. 393-399.
 235. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy / S. Rivankar // Journal of cancer research and therapeutics. – 2014. – T. 10. – № 4. – C. 853.

236. Roback J. D. Multicenter evaluation of PCR methods for detecting CMV DNA in blood donors / J. D. Roback, C. D. Hillyer, W. L. Drew, M. E. Laycock, J. Luka, E. S. Mocarski, B. Slobedman, J. W. Smith, C. Soderberg-Naucler, D. S. Todd, S. Woxenius, M. P. Busch // *Transfusion*. – 2001. – T. 41. – № 10. – C. 1249-1257.
237. Rosenfeldt M. T. E2F1 drives chemotherapeutic drug resistance via ABCG2 / M. T. Rosenfeldt, L. A. Bell, J. S. Long, J. O'Prey, C. Nixon, F. Roberts, C. Dufes, K. M. Ryan // *Oncogene*. – 2014. – T. 33. – № 32. – C. 4164-4172.
238. Rossetto C. C. Cis and trans acting factors involved in human cytomegalovirus experimental and natural latent infection of CD14 (+) monocytes and CD34 (+) cells / C. C. Rossetto, M. Tarrant-Elorza, G. S. Pari // *PLoS pathogens*. – 2013. – T. 9. – № 5. – C. e1003366.
239. Roy S. Cross-talk in cell death signaling / S. Roy, D. W. Nicholson // *Journal of Experimental Medicine*. – 2000. – T. 192. – № 8. – C. F21-F26.
240. Ryckman B. J. HCMV gH/gL/UL128–131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors / B. J. Ryckman, M. C. Chase, D. C. Johnson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – T. 105. – № 37. – C. 14118-14123.
241. Saffert R. T. Human cytomegalovirus gene expression is silenced by Daxx-mediated intrinsic immune defense in model latent infections established in vitro / R. T. Saffert, R. F. Kalejta // *Journal of virology*. – 2007. – T. 81. – № 17. – C. 9109-9120.
242. Saffert R. T. Cellular and viral control over the initial events of human cytomegalovirus experimental latency in CD34+ cells / R. T. Saffert, R. R. Penkert, R. F. Kalejta // *Journal of virology*. – 2010. – T. 84. – № 11. – C. 5594-5604.
243. Samanta M. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma / M. Samanta, L. Harkins, K. Klemm, W. J. Britt, C. S. Cobbs // *The Journal of urology*. – 2003. – T. 170. – № 3. – C. 998-1002.

244. Sanchez E. L. Viral activation of cellular metabolism / E. L. Sanchez, M. Lagunoff // *Virology*. – 2015. – T. 479. – C. 609-618.
245. Santag S. Recruitment of the tumour suppressor protein p73 by Kaposi's Sarcoma Herpesvirus latent nuclear antigen contributes to the survival of primary effusion lymphoma cells / S. Santag, W. Jager, C. B. Karsten, S. Kati, M. Pietrek, D. Steinemann, G. Sarek, P. M. Ojala, T. F. Schulz // *Oncogene*. – 2013. – T. 32. – № 32. – C. 3676-3685.
246. Saravani S. Human cytomegalovirus in oral squamous cell carcinoma in southeast of Iran / S. Saravani, H. Kadeh, E. Miri-Moghaddam, A. Zekri, N. Sanadgol, A. Gholami // *Jundishapur journal of microbiology*. – 2015. – T. 8. – № 8. – C. e21838
247. Sathe A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in bladder cancer / A. Sathe, R. Nawroth // *Urothelial Carcinoma*. – Humana Press, New York, NY, 2018. – C. 335-350.
248. Sholler G. L. S. A phase I trial of DFMO targeting polyamine addiction in patients with relapsed/refractory neuroblastoma / G. L. S. Sholler, E. W. Gerner, G. Bergendahl, R. B. MacArthur, A. VanderWerff, T. Ashikaga, D. Eslin // *PLoS One*. – 2015. – T. 10. – № 5. – C. e0127246.
249. Schipper R. G. Antitumor activity of the polyamine analog N1, N11-diethylnorspermine against human prostate carcinoma cells / R. G. Schipper, G. Deli, P. Deloyer, W. P. H. J. Lange, J. A. Schalken, A. A. J. Verhofstad // *The Prostate*. – 2000. – T. 44. – № 4. – C. 313-321.
250. Schmidt-Hieber M. The prognostic impact of the cytomegalovirus serostatus in patients with chronic hematological malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a report from the Infectious Diseases Working Party of EBMT / M. Schmidt-Hieber, G. Tridello, P. Ljungman, M. Mikulska, N. Knelange, D. Blaise, I. Yakoub-Agha // *Annals of hematology*. – 2019. – T. 98. – № 7. – C. 1755-1763.

251. Schommartz T. Differential requirement of human cytomegalovirus UL112-113 protein isoforms for viral replication / T. Schommartz, J. Tang, R. Brost, W. Brune // *Journal of virology*. – 2017. – T. 91. – № 17. – C. e00254-17.
252. Shamas-Din A. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins / A. Shamas-Din, J. Kale, B. Leber, D. W. Andrews // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2013. – T. 5. – № 4. – C. a008714.
253. Sharma A. The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression / A. Sharma, W. S. Yeow, A. Ertel, I. Coleman, N. Clegg, C. Thangavel, C. Morrissey, X. Zhang, C. E. S. Comstock, A. K. Witkiewicz, L. Gomella, E. S. Knudsen, P. S. Nelson, K. E. Knudsen // *The Journal of clinical investigation*. – 2010. – T. 120. – № 12. – C. 4478-4492.
254. Shnayder M. Defining the transcriptional landscape during cytomegalovirus latency with single-cell RNA sequencing / M. Shnayder, A. Nachshon, B. Krishna, E. Poole, A. Boshkov, A. Binyamin, I. Maza, J. Sinclair, M. Schwartz, N. Stern-Ginossar, R. M. Sandri-Goldin // *MBio*. – 2018. – T. 9. – № 2. – C. e00013-18.
255. Simanek A. M. Seropositivity to cytomegalovirus, inflammation, all-cause and cardiovascular disease-related mortality in the United States / A. M. Simanek, J. B. Dowd, G. Pawelec, D. Melzer, A. Dutta, A. E. Aiello // *PloS one*. – 2011. – T. 6. – № 2. – C. e16103.
256. Simioni C. Targeting mTOR in acute lymphoblastic leukemia / C. Simioni, A. M. Martelli, G. Zauli, E. Melloni, L. M. Neri // *Cells*. – 2019. – T. 8. – № 2. – C. 190.
257. Sinclair J. Chromatin structure regulates human cytomegalovirus gene expression during latency, reactivation and lytic infection / J. Sinclair // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. – 2010. – T. 1799. – № 3-4. – C. 286-295.
258. Sinzger C. Cytomegalovirus cell tropism / C. Sinzger, M. Digel, G. Jahn // *Human cytomegalovirus*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. – C. 63-83.

259. Skaletskaya A. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation / A. Skaletskaya, L. M. Bartle, T. Chittenden, A. L. McCormick, E. S. Mocarski, V. S. Goldmacher // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – T. 98. – № 14. – C. 7829-7834.
260. Slobedman B. Human cytomegalovirus latent infection and associated viral gene expression / B. Slobedman, J. Z. Cao, S. Avdic, B. Webster, S. McAllery, A. K. Cheung, A. Abendroth // *Future microbiology*. – 2010. – T. 5. – № 6. – C. 883-900.
261. Soderberg-Naucler C. Cytomegalovirus in human brain tumors: Role in pathogenesis and potential treatment options / C. Soderberg-Naucler, J. I. Johnsen // *World journal of experimental medicine*. – 2015. – T. 5. – № 1. – C. 1-10.
262. Soleimani A. Role of Regulatory Oncogenic or Tumor Suppressor miRNAs of PI3K/AKT Signaling Axis in the Pathogenesis of Colorectal Cancer / A. Soleimani, F. Rahmani, G. A. Ferns, M. Ryzhikov, A. Avan, S. M. Hassanian // *Current pharmaceutical design*. – 2018. – T. 24. – № 39. – C. 4605-4610.
263. Soroceanu L. Is HCMV a tumor promoter? / L. Soroceanu, C. S. Cobbs // *Virus research*. – 2011. – T. 157. – № 2. – C. 193-203.
264. Spector D. H. Human cytomegalovirus riding the cell cycle / D. H. Spector // *Medical microbiology and immunology*. – 2015. – T. 204. – № 3. – C. 409-419.
265. Speidel D. The role of DNA damage responses in p53 biology / D. Speidel // *Archives of toxicology*. – 2015. – T. 89. – № 4. – C. 501-517.
266. Stern L. Human cytomegalovirus latency and reactivation in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients / L. Stern, B. Withers, S. Avdic, D. Gottlieb, A. Abendroth, E. Blyth, B. Slobedman // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – T. 10. – C. 1186.
267. Stiewe T. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? / T. Stiewe, B. M. Putzer // *Cell death and differentiation*. – 2002. – T. 9. – № 3. – C. 237-245.
268. Strehl C. Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells / C. Strehl, T. Gaber, L. Maurizi, M. Hahne, R. Rauch, P. Hoff, T. Haupl, M. Hofmann-

- Amtenbrink, A. R. Poole, H. Hofmann, F. Buttgereit // International journal of nanomedicine. – 2015. – T. 10. – C. 3429-3445.
269. Sylwester A. W. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects / A. W. Sylwester, B. L. Mitchell, J. B. Edgar, C. Taormina, C. Pelte, F. Ruchti, P. R. Sleath, K. H. Grabstein, N. A. Hosken, F. Kern, J. A. Nelson, L. J. Picker // Journal of Experimental Medicine. – 2005. – T. 202. – № 5. – C. 673-685.
 270. Tabchi S. Retrospective Review of the Use of High-Dose Cyclophosphamide, Bortezomib, Doxorubicin, and Dexamethasone for the Treatment of Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia / S., Tabchi, R., Nair, C., Kunacheewa, K. K., Patel, H. C., Lee, S. K., Thomas, B. Amini, S. Ahmed, R. S. Mehta, Q. Bashir, M. H. Qazilbash, D. M. Weber, R. Z. Orlowski, R. Alexanian, L. Feng, E. E. Manasanch // Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2019.
 271. Taha M. S. Expression of cytomegalovirus in glioblastoma multiforme: Myth or reality? / M. S. Taha, B. A. Abdalhamid, S. A. El-Badawy, Y. M. Sorour, F. M. Almsned, M. A. Al-Abbadi // British journal of neurosurgery. – 2016. – T. 30. – № 3. – C. 307-312.
 272. Taher C. High prevalence of human cytomegalovirus proteins and nucleic acids in primary breast cancer and metastatic sentinel lymph nodes / C. Taher, J. de Boniface, A. A. Mohammad, P. Religa, J. Hartman, K. C. Yaiw, J. Frisell, A. Rahbar, C. Soderberg-Naucleer // PloS one. – 2013. – T. 8. – № 2. – C. e56795.
 273. Tarrant-Elorza M. Maintenance and replication of the human cytomegalovirus genome during latency / M. Tarrant-Elorza, C. C. Rossetto, G. S. Pari // Cell host & microbe. – 2014. – T. 16. – № 1. – C. 43-54.
 274. Terrasson J. p73-dependent apoptosis through death receptor: impairment by human cytomegalovirus infection / J. Terrasson, S. Allart, H. Martin, J. Lulé, H. Haddada, D. Caput, C. Davrinche // Cancer research. – 2005. – T. 65. – № 7. – C. 2787-2794.
 275. Tophkhane C. p53 inactivation upregulates p73 expression through E2F-1 mediated transcription / C. Tophkhane, S. H. Yang, Y. Jiang, Z. Ma, D.

- Subramaniam, S. Anant, Shingo Yogosawa, T. Sakai, W. G. Liu, S. Edgerton, A. Thor, X. Yang // PloS one. – 2012. – T. 7. – № 8. – C. e43564.
276. Umashankar M. A novel human cytomegalovirus locus modulates cell type-specific outcomes of infection / M. Umashankar, A. Petrucelli, L. Cicchini, P. Caposio, C. N. Kreklywich, M. Rak, Farah Bughio, D. C. Goldman, K. L. Hamlin, J. A. Nelson, W. H. Fleming, D. N. Streblow, F. Goodrum // PLoS pathogens. – 2011. – T. 7. – № 12. – C. e1002444.
277. Umashankar M. Hematopoietic long-term culture (hLTC) for human cytomegalovirus latency and reactivation / M. Umashankar, F. Goodrum // Human Cytomegaloviruses. – Humana Press, Totowa, NJ, 2014. – C. 99-112.
278. Vaillant V. Seroepidemiological analysis and literature review of the prevalence of Epstein-Barr virus and herpesvirus infections in pediatric cases with non-Hodgkin lymphoma in Central Europe / V. Vaillant, A. Reiter, M. Zimmermann, H. J. Wagner // Pediatric blood & cancer. – 2019. – T. 66. – № 7. – C. e27752.
279. Van Nostrand J. L. The p53 family members have distinct roles during mammalian embryonic development / J. L. Van Nostrand, M. E. Bowen, H. Vogel, M. Barna, L. D. Attardi // Cell death and differentiation. – 2017. – T. 24. – № 4. – C. 575-579.
280. Vanarsdall A. L. CD147 promotes entry of pentamer-expressing human cytomegalovirus into epithelial and endothelial cells / A. L. Vanarsdall, S. R. Pritchard, T. W. Wisner, J. Liu, T. S. Jardetzky, D. C. Johnson // MBio. – 2018. – T. 9. – № 3. – C. e00781-18.
281. Vera J. Kinetic Modeling–Based Detection of Genetic Signatures That Provide Chemoresistance via the E2F1-p73/DNp73-miR-205 Network / J. Vera, U. Schmitz, X. Lai, D. Engelmann, F. M. Khan, O. Wolkenhauer, B. M. Putzer // Cancer research. – 2013. – T. 73. – № 12. – C. 3511-3524.
282. Verma S. Recent Advances in Therapeutic Applications of Bisbenzimidazoles / S. Verma, V. Ravichandiran, N. Ranjan, S. J. S. Flora // Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates)). – 2019.

283. Vikhreva P. p73 alternative splicing: exploring a biological role for the C-terminal isoforms / P. Vikhreva, G. Melino, I. Amelio // *Journal of molecular biology*. – 2018. – T. 430. – № 13. – C. 1829-1838.
284. Vomaske J. Human cytomegalovirus US28: a functionally selective chemokine binding receptor / J. Vomaske, J. A. Nelson, D. N. Streblow // *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*. – 2009. – T. 9. – № 5. – C. 548-556.
285. Vuaroqueaux V. Low E2F1 transcript levels are a strong determinant of favorable breast cancer outcome / V. Vuaroqueaux, P. Urban, M. Labuhn, M. Delorenzi, P. Wirapati, C. C. Benz, R. Flury, H. Dieterich, F. Spyrtos, U. Eppenberger, S. Eppenberger-Castori // *Breast Cancer Research*. – 2007. – T. 9. – № 3. – C. R33.
286. Wagenknecht N. Contribution of the major ND10 proteins PML, hDaxx and Sp100 to the regulation of human cytomegalovirus latency and lytic replication in the monocytic cell line THP-1 / N. Wagenknecht, N. Reuter, M. Scherer, A. Reichel, R. Muller, T. Stamminger // *Viruses*. – 2015. – T. 7. – № 6. – C. 2884-2907.
287. Wang S. Alteration of glucocorticoid receptors and exacerbation of inflammation during lytic cytomegalovirus infection in THP-1 cells / S. Wang, Y. Dou, H. Yang, A. Ni, R. Zhang, J. Qian // *FEBS Open Bio*. – 2017. – T. 7. – № 12. – C. 1924-1931.
288. Wang X. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus / X. Wang, S. M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, E. S. Huang // *Nature*. – 2003. – T. 424. – № 6947. – C. 456-461.
289. Wang Y. Epigenetic factor EPC1 is a master regulator of DNA damage response by interacting with E2F1 to silence death and activate metastasis-related gene signatures / Y. Wang, V. Alla, D. Goody, S. K. Gupta, A. Spitschak, O. Wolkenhauer, B. M. Putzer, D. Engelmann // *Nucleic acids research*. – 2016. – T. 44. – № 1. – C. 117-133.
290. White K. L. Human cytomegalovirus latency-associated protein pORF94 is dispensable for productive and latent infection

- / K. L. White, B. Slobedman, E. S. Mocarski // Journal of virology. – 2000. – T. 74. – № 19. – C. 9333-9337.
291. Whitley R. J. The use of antiviral drugs during the neonatal period / R. J. Whitley // Clinics in perinatology. – 2012. – T. 39. – № 1. – C. 69-81.
 292. Wiemels J. L. Early Infection with Cytomegalovirus and Risk of Childhood Hematologic Malignancies / J. L. Wiemels, M. Talback, S. Francis, M. Feychting // Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers. – 2019. – T. 28. – № 6. – C. 1024-1027.
 293. Wildum S. In vitro drug combination studies of Letemovir (AIC246, MK-8228) with approved anti-human cytomegalovirus (HCMV) and anti-HIV compounds in inhibition of HCMV and HIV replication / S. Wildum, H. Zimmermann, P. Lischka // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2015. – T. 59. – № 6. – C. 3140-3148.
 294. Wille P. T. Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein / P. T. Wille, T. W. Wisner, B. Ryckman, D. C. Johnson // MBio. – 2013. – T. 4. – № 3. – C. e00332-13.
 295. Wolmer-Solberg N. Frequent detection of human cytomegalovirus in neuroblastoma: a novel therapeutic target? / N. Wolmer-Solberg, N. Baryawno, A. Rahbar, D. Fuchs, J. Odeberg, C. Taher, V. Wilhelmi, J. Milosevic, A. A. Mohammad, T. Martinsson, B. Sveinbjornsson, J. I. Johnsen, P. Kogner, C. Soderberg-Naucler // International journal of cancer. – 2013. – T. 133. – № 10. – C. 2351-2361.
 296. Wu C. E. mTOR inhibitors in advanced biliary tract cancers / C. E. Wu, M. H. Chen, C. N. Yeh // International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – № 3. – C. 500.
 297. Wu K. Role of PDGF receptor- α during human cytomegalovirus entry into fibroblasts / K. Wu, A. Oberstein, W. Wang, T. Shenk // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – T. 115. – № 42. – C. E9889-E9898.

298. Yang X. A review on the effect of traditional chinese medicine against anthracycline-induced cardiac toxicity / X. Yang, N. Liu, X. Li, Y. Yang, X. Wang, L. Li, L. Jiang, Y. Gao, H. Tang, Y. Tang, Y. Xing, H. Shang // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – T. 9. – C. 444.
299. Yee L. F. Ectopic expression of HCMV IE72 and IE86 proteins is sufficient to induce early gene expression but not production of infectious virus in undifferentiated promonocytic THP-1 cells / L. F. Yee, P. L. Lin, M. F. Stinski // *Virology*. – 2007. – T. 363. – № 1. – C. 174-188.
300. Yin Y. PI3K-Akt-mTOR axis sustains rotavirus infection via the 4E-BP1 mediated autophagy pathway and represents an antiviral target / Y. Yin, W. Dang, X. Zhou, L. Xu, W. Wang, W. Cao, S. Chen, J. Su, X. Cai, S. Xiao, M. P. Peppelenbosch, Q. Pan // *Virulence*. – 2018. – T. 9. – № 1. – C. 83-98.
301. Yurinskaya V. A comparative study of U937 cell size changes during apoptosis initiation by flow cytometry, light scattering, water assay and electronic sizing / V. Yurinskaya, N. Aksenov, A. Moshkov, M. Model, T. Goryachaya, A. Vereninov // *Apoptosis*. – 2017. – T. 22. – № 10. – C. 1287-1295.
302. Zhan L. Promising roles of mammalian E2Fs in hepatocellular carcinoma / L. Zhan, C. Huang, X. M. Meng, Y. Song, X. Q. Wu, C. G. Miu, X. S. Zhan J. Li // *Cellular signalling*. – 2014. – T. 26. – № 5. – C. 1075-1081.
303. Zhan L. E2F1: a promising regulator in ovarian carcinoma / L. Zhan, Y. Zhang, W. Wang, E. Song, Y. Fan, B. Wei // *Tumor Biology*. – 2016. – T. 37. – № 3. – C. 2823-2831.
304. Zhang L. Human cytomegalovirus detection in gastric cancer and its possible association with lymphatic metastasis / L. Zhang, G. Guo, J. Xu, X. Sun, W. Chen, J. Jin, C. Hu, P. Zhang, X. Shen, X. Xue // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2017. – T. 88. – № 1. – C. 62-68.
305. Zhang P. TAp73-mediated the activation of c-Jun N-terminal kinase enhances cellular chemosensitivity to cisplatin in ovarian cancer cells / P. Zhang, S. S. Liu, H. Y. S. Ngan // *PloS one*. – 2012. – T. 7. – № 8. – C. e42985.

306. Zhang Y. L. Cytomegalovirus infection is associated with AML relapse after allo-HSCT: a meta-analysis of observational studies / Y. L. Zhang, Y. Zhu, Q. Xiao, L. Wang, L. Liu, X. H. Luo // *Annals of hematology*. – 2019. – T. 98. – № 4. – C. 1009-1020.
307. Zhu H. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis / H. Zhu, Y. Shen, T. Shenk // *Journal of virology*. – 1995. – T. 69. – № 12. – C. 7960-7970.
308. Zhu W. Expression and prognostic significance of TAp73 and Δ Np73 in FIGO stage I-II cervical squamous cell carcinoma / W. Zhu, X. Pan, Z. Yang, P. Xing, Y. Zhang, F. Li, X. Lu // *Oncology letters*. – 2015. – T. 9. – № 5. – C. 2090-2094.