

На правах рукописи

СУВОРОВА  
Мария Александровна

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ  
ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ  
МОДЕЛЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

14.03.03 – патологическая физиология  
03.02.03-микробиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины»

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук

**Киселёва Екатерина Прохоровна**

Доктор медицинских наук

**Ермоленко Елена Игоревна**

**Официальные оппоненты**

Профессор, доктор медицинских наук

**Савичева Алевтина Михайловна**

Заведующая лабораторией микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта

Доктор биологических наук

**Иванов Вадим Александрович**

Заведующий лабораторией опухолевого роста Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.022.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр. д. 69-71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <http://iemspsb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ года

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 001.022.02

кандидат биологических наук, доцент

**Алешина Галина Матвеевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Несмотря на то, что за последнее время достигнут существенный прогресс в области терапии онкологических заболеваний, они продолжают оставаться одной из наиболее распространенных причин смерти в развитых странах. Общепринятые методы, такие как лучевая и химиотерапия, не дают полного излечения, что обуславливает необходимость поиска новых альтернативных методов, одним из которых является лечение опухолей с применением микроорганизмов.

Патогенетические особенности опухолей позволяют им «ускользнуть» от действия макрофагов и других клеток системы врождённого иммунитета, поэтому одной из магистральных линий поиска способов терапии опухолей является изучение возможностей стимуляции воспалительного процесса и активации клеток его реализующих для лечения злокачественных образований. Для этой цели используют живые, аттенуированные или генетически модифицированные бактерии, которые обладают прямым цитотоксическим эффектом и оказывают воздействие на клетки иммунной системы [Jessy, 2011]. Изучение способов и механизмов реализации эффектов действия клеток и веществ с противоопухолевой активностью является важнейшей задачей современной патофизиологии.

Особый интерес вызывает применение для этих целей бактерий *Streptococcus pyogenes* и продуктов их жизнедеятельности [Hopton Cann, 2003]. Эти бактерии являются хорошо изученными патогенными микроорганизмами, выделяемыми исключительно из образцов биологического материала человека. Известно, что *S. pyogenes* могут проявлять как прямые, так и опосредованные цитолитические воздействия на эукариотические клетки, обусловленные наличием различных ферментов и токсинов [Forbes, 2006]. Существенным преимуществом использования *S. pyogenes* является высокая чувствительность стрептококков к пенициллину, которая позволяет легко уничтожить их после терапевтического применения. При этом *S. pyogenes* могут длительное время существовать в тканях, плохо снабжаемых кислородом, в том числе в злокачественных новообразованиях [Forbes, 2006]. Необходимо отметить, что *S. pyogenes* относятся к микроорганизмам, которые могут быть подвергнуты генно-инженерной модификации, что позволяет инактивировать отдельные гены для изучения их свойств. Таким образом, *S.pyogenes* являются

перспективными микроорганизмами для создания на их основе новых подходов к противоопухолевой терапии.

**Степень разработанности темы.** *S. pyogenes* стал впервые использоваться в клинической практике для терапии злокачественных опухолей в конце 19 века американским хирургом W.Coley [Nauts, 1953]. Coley отмечал, что наилучшего результата ему удавалось достигнуть, когда в ходе терапии у пациента развивался мощный воспалительный процесс. Для клинического применения был разработан и активно применялся так называемый “токсин Коли”, который представлял собой фильтрат термически обработанных *S. pyogenes*, не содержащий живых бактерий. В 50-60-ых годах XX века было опубликовано несколько статей по применению фильтратов *S. pyogenes* (“токсина Коли”) для лечения экспериментальных опухолей, в которых было показано, что саркома S37 у мышей является опухолью, чувствительной к данному методу терапии [Navas, 1958]. В начале XXI века была опубликована монография, обобщившая успешный многолетний опыт применения *S. pyogenes* штамма «Гуров» в клинической практике для терапии онкологических заболеваний на базе Пермского государственного медицинского университета [Черешнев В.А. 2006]. Позднее была продемонстрирована успешная возможность лечения опухоли поджелудочной железы у мышей после однократного введения живой культуры *S. pyogenes* M49 серотипа штамм №591 внутрь опухоли [Maletzki, 2008]. Предполагают, что этот эффект обусловлен ответом организма на патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (РАМР), присутствующие на микроорганизмах, что может усиливать противоопухолевую защиту организма. Однако, механизмы противоопухолевого действия *S. pyogenes* до сих пор недостаточно ясны.

При этом также было показано, что живые бактерии оказались более эффективными, чем убитые *S. pyogenes* [Maletzki, 2008]. Эти данные доказывают необходимость сохранять жизнеспособность *S. pyogenes*. Синтез микроорганизмами широкого набора биологически активных веществ, включающих токсины и разнообразные ферменты, в физиологически активном состоянии обуславливает более выраженное противоопухолевое действие живых бактерий. В частности, показано, что стрептококковый фермент – аргининдеиминаза способен в существенной степени замедлять развитие большой группы опухолевых клеток [Feidler, 2015]. Однако существенным

недостатком такого рода терапии является высокая токсичность *S. pyogenes*. С целью снижения потенциальной опасности живых стрептококков для организма нами была поставлена задача сконструировать штамм *S. pyogenes*, лишенный М-белка – одного из главных факторов патогенности стрептококков.

**Цель исследования.** Изучить противоопухолевое действие модифицированных штаммов *S. pyogenes* на экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* и обосновать новые подходы к терапии опухолей с использованием модифицированных бактерий.

**Задачи исследования:**

1. Для снижения вирулентности живых *S. pyogenes* штамма «Гуров», используемых при лечении опухолей в эксперименте, получить и охарактеризовать новый мутантный штамм с инактивированным геном М-белка (*emm*<sup>-</sup>).
2. Провести сравнительный анализ генетических различий между штаммами «Гуров» и «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) с помощью полногеномного секвенирования.
3. Оценить динамику опухолевого роста и выживаемость у мышей с перевиваемыми опухолями - гепатомой 22а и саркомой S37 при введении штаммов *S. pyogenes* «Гуров» и «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1).
4. Сравнить прямое цитотоксическое воздействие исходного штамма *S. pyogenes* «Гуров» и его мутанта «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) на клетки гепатомы 22а *in vitro*.
5. Исследовать функциональную активность перитонеальных макрофагов интактных мышей в системе *in vitro* в ответ на воздействие штаммов *S. pyogenes* «Гуров» и «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1).
6. Изучить рост клеток гепатомы 22а в условиях *in vitro* и выживаемость мышей с саркомой S37 при воздействии штамма *S. pyogenes* M49-16 с инактивированным геном аргининдеиминазы.

**Научная новизна исследования.** Впервые получен и охарактеризован новый штамм *S. pyogenes* с инактивированным геном М-белка, обладающий противоопухолевой активностью в отношении перевиваемых опухолей мышей *in vivo* и *in vitro*. В результате полногеномного секвенирования штамма *S. pyogenes* «Гуров» установлено, что штамм «Гуров» относится к серотипу M111, а не к серотипу M39, как считалось ранее; получены ранее неизвестные данные

о строении Mga регулона M111 серотипа. Впервые показано, что инактивация белка M-белка 111 серотипа приводит к повышению адгезивной способности *S. pyogenes* в отношении клеток гепатомы 22а мышей. Также впервые показано, что инактивация гена белка M111 приводит к снижению антифагоцитарных свойств стрептококков в отношении резидентных перитонеальных макрофагов интактных мышей. Кроме того, инактивация гена белка M111 влияет на способность стрептококков индуцировать синтез цитокинов и усиливать продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами интактных мышей. Впервые показан противоопухолевый эффект аргининдеиминазы, продуцируемой *S. pyogenes* M 49 серотипа, на модели перевиваемой саркомы S37 мышей *in vivo*.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Для проведения экспериментов по изучению противоопухолевой активности живых *S. pyogenes* получен и охарактеризован новый изогенный мутант штамма «Гуров» с инактивированным геном M-белка «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1).
2. Наличие единичной вставки интегративной плазмиды в области кодирования гена *emm*, обнаруженной при сравнительном полногеномном секвенировании исходного штамма *S. pyogenes* «Гуров» и его мутанта «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1), доказывает, что целостность генома мутантного штамма в других областях не нарушена.
3. На моделях перевиваемых опухолей у мышей продемонстрировано подавление опухолевого роста при введении живых бактерии *S. pyogenes* штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) по сравнению с исходным штаммом «Гуров».
4. Бактерии штамма *S. pyogenes* «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) обладают более выраженным прямым цитотоксическим действием в отношении клеток гепатомы 22а *in vitro* по сравнению с исходным штаммом «Гуров».
5. Стимулирование продукции активных форм кислорода в резидентных перитонеальных макрофагах бактериями *S. pyogenes* штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1), в отличие от исходного штамма «Гуров» можно рассматривать как один из механизмов противоопухолевого действия этих бактерий.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Представленная диссертационная работа является фундаментальным научным исследованием, результаты которого вносят вклад в изучение прямого и опосредованного цитотоксического воздействия *S. pyogenes* на злокачественные перевиваемые

опухоли у животных. Работа носит экспериментальный характер. Результаты исследования создают основу для дальнейшего изучения механизмов противоопухолевого действия живых *S. pyogenes* как потенциальных средств терапии опухолевых заболеваний человека. Заявка на изобретение № 2016152829 от 30.12.2015 принята и проходит экспертизу по существу. Штамм *S. pyogenes* «Гуров» *emm*<sup>-</sup> был депонирован нами и находится в коллекции патогенных штаммов ФБУН ГНУ ПМБ (Оболенск).

**Личное участие автора в получении результатов.** Автором, совместно с научными руководителями, были спланированы и лично выполнены все экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo*, а также проведена статистическая обработка данных. В постановке и решении конкретных задач, организации и выполнении исследований, обработке и интерпретации полученных результатов автору принадлежит ведущая роль.

**Публикации по материалам исследования.** По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 4 публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 1 в зарубежном журнале. Принята заявка № 2016152829 от 30.12.2015 на изобретение, проходит экспертизу по существу. Штамм «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) депонирован в коллекции патогенных штаммов ФБУН ГНУ ПМБ (Оболенск).

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов, полученных при проведении экспериментов, подтверждается достаточным и репрезентативным объёмом выборки выполненных наблюдений и контрольных исследований и подтверждена адекватными методами статистической обработки. Методы математической обработки полученных результатов соответствуют поставленным задачам. Материалы диссертации доложены на XXI, XXII, XXIV, XXVI конгрессах европейского клинического микробиологического общества ECCMID (Милан, Италия, 2011 г.; Лондон, Великобритания, 2012 г., Барселона, Испания, 2014, Амстердам, Нидерланды, 2016), на конференции “Современная диагностика и лечение стрептококков группы А в клинической практике” (Рим, Италия 2013), XIX конгрессе им. Ленсфильд по стрептококкам и стрептококковым заболеваниям (Буэнос-Айрес, Аргентина, 2014), на X, XIV и XV Всероссийских научных форумах с международным участием им. акад. В.И. Иоффе “Дни иммунологии в Санкт-

Петербурге» (Санкт-Петербург, Россия 2011, 2015.), на конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (Томск, Россия, 2015 г.), на II и III Петербургских международных онкологических форумах «Белые ночи 2016» и «Белые ночи 2017».

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов работы, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 154 источников, 10 отечественных и 144 зарубежных. Текст диссертации иллюстрирован 10 таблицами и 37 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Экспериментальные животные.** В работе использовались самцы мышей линии СЗНА, беспородных мышей, а также гибридов F1 (СВА х С57BL/6) весом 16-18 г, полученных из питомника «Рапполово», всего 980 животных. Животные содержались при циклическом освещении: 12 часов свет/12 часов темнота и получали стандартную еду (концентрированный комбинированный корм, изготовленный в виде брикетов) и воду *ad libitum*. Эксперименты проводили с соблюдением этических принципов по работе с лабораторными животными и одобрены локальным этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ» (протокол №1 от 16.03.2017).

**Экспериментальные опухоли.** Клетки линии гепатомы 22а были получены из коллекции клеточных культур ФГБНУ института цитологии РАН. Их культивировали в среде DMEM, с добавлением 10% фетальной сыворотки, 0,6 мг/мл глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с содержанием углекислого газа 5%. Клетки асцитной перевиваемой саркомы S37 были любезно предоставлены профессором Якубовской Р.И. (МНИОИ им. Герцена). Их пассировали в асцитной форме на беспородных мышах. Для получения солидных опухолей мышам линии СЗНА подкожно инокулировали в область спины 2x10<sup>5</sup> клеток сингенной гепатомы 22а в объеме 0,2 мл физиологического раствора, а беспородным мышам – аналогичное количество клеток саркомы S37.

**Схема введения *S. pyogenes*.** Суспензию живых бактерий, находившихся в логарифмической фазе роста довели до концентрации 10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Бактерии в объеме 50 мкл двукратно вводили внутрь опухолей мышей. Первую



инъекцию осуществляли через 9 суток от начала инокуляции опухолевых клеток при достижении опухолевым узлом размера 2-3 мм<sup>3</sup>. Повторную инъекцию проводили с интервалом 5 суток.

**Количественные высевы бактерий из опухолей и селезенок мышей.** Через 6 и 24 часа после первой и повторной инъекции стрептококков внутрь опухоли животных умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Выделяли опухоль и селезенку, гомогенизировали в стерильном физиологическом растворе и осуществляли высевы в трех разведениях на селективную агаризованную среду с добавлением антибиотиков и без добавления, для определения жизнеспособности бактерий и сохранности наличия мутации.

**Бактерии, использованные в работе.** Штамм *S. pyogenes* «Гуров» неустановленного серотипа, был любезно предоставлен академиком В.А. Черешневым. Штамм был первоначально получен от больного рожистым воспалением в 1938 году и находился в коллекции музея патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Штаммы *S. pyogenes* M49 серотипа, являющиеся клиническими изолятами, получены из коллекции Оклахомского университета (США).

**Конструирование штамма *S. pyogenes*, мутантного по гену М-белка на основе штамма «Гуров».** Для создания штамма, неспособного экспрессировать М-белок, участок гена, кодирующий центральную часть гена М-белка, был проклонирован в интегративную плазмиду *p7ermB*, которую встраивали в стрептококки с помощью электропорации [Suvorov A., 1986]. Клон с интегрированной плазмидой был маркирован за счет введения гена устойчивости к эритромицину в область структурной части *emt* гена. Наличие мутации оценивали путем посева на селективную среду с эритромицином, проведения ПЦР и частичного секвенирования в участке интеграции плазмиды.

**Полногеномное секвенирование штамма «Гуров» и его мутанта по М-белку** было проведено в сотрудничестве с доктором М. Arumugam (Университет Копенгагена, Дания). Библиотеки фрагментов готовили с использованием набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera XT (Illumina, США) с последующим парным секвенированием 251 п.н. на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Обработка полученных данных была выполнена с использованием программы SPAdes версии 3.10.0.

**Оценку цитотоксической активности стрептококков в отношении клеток гепатомы 22a *in vitro*** проводили путем совместного культивирования опухолевых клеток и живых стрептококков в пяти различных разведениях в течение 4 часов в среде DMEM с добавлением 5% бычьей фетальной сыворотки без антибиотиков [Maletzki et al., 2008]. Клетки фиксировали и окрашивали метиленовым синим, после чего определяли оптическую плотность спектрофотометрически.

Второй метод оценки цитотоксической активности стрептококков заключался в измерении электрического сопротивления монослоя клеток гепатомы 22a в течение суток в режиме реального времени и его учете при помощи системы xCELLigence (ACEA, США) в виде «клеточного индекса».

**Оценку адгезивных свойств стрептококков проводили в отношении клеток гепатомы 22a *in vitro***, которые культивировали на покровных стёклах в 24-луночной планшете в присутствии живых бактерий концентрациях  $1 \times 10^5$  на 1 мл, в соотношении 100:1 в течении 30 минут при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Стекла с окрашенными клетками микроскопировали и оценивали адгезию визуально.

**Оценка фагоцитоза стрептококков клетками перитонеального экссудата интактных мышей (КПЭ).** КПЭ получали путем перитонеального лаважа и оценивали их фагоцитарную активность в отношении живых стрептококков путем их инкубирования в течении 30 минут в соотношении 1:3 (макрофаги/бактерии) в среде без антибиотиков. Результаты оценивали микроскопически по фагоцитарному числу и фагоцитарному индексу.

**Оценка функциональной активности макрофагов.** КПЭ культивировали в течении 2 часов с живыми бактериями в соотношении 1:3 бактерии/КПЭ. После чего добавляли ампициллин в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали сутки. Функциональную активность макрофагов определяли по их способности восстанавливать краситель нитросиний тетразолий (НСТ-тест) [Киселева, Полевщиков], а также по продукции нитритов, выявляемых в надосадочной жидкости [Migliorini]. В качестве стандартных активаторов для определения нитритов использовали ЛПС *E. coli* O55B5 (Sigma) в концентрации 50 нг/мл и форболовый эфир в концентрации 1 мкг/мл для НСТ-теста. Кроме того, в надосадках КПЭ определяли содержание цитокинов IL-10, IL-6 и IL-17 с

помощью иммуноферментных наборов (Affimetrix, Австрия). В качестве стандартного стимулятора использовали ЛПС *E. coli* O55B5 (Sigma) в конечной концентрации 1мкг/мл.

**Методы статистического анализа полученных данных.** Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента, с помощью программы STATISTICA для Windows (версия 8.1). Анализ выживаемости животных проводили по методу Каплана-Мейера. Для сравнения двух групп использовались критерии Гехана и Кокса. Критерием статистической достоверности полученных результатов считали общепринятую в медико-биологических исследованиях величину  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных экспериментах с использованием коллекции штаммов *S. pyogenes* M49 серотипа и штамма «Гуров» была подобрана оптимальная схема введения живых стрептококков внутрь опухоли, включающая дозу вводимых бактерий и кратность введения (Рис. 1).

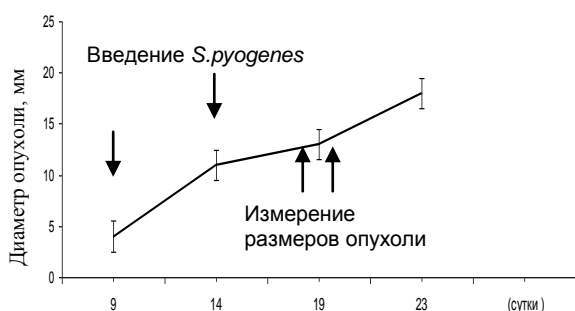


Рис. 1. Схема эксперимента. Мышам инокулировали  $2 \times 10^5$  клеток опухоли подкожно в область спины. На 9 и 14 сутки после инокуляции внутрь опухоли вводили 50 мкл *S. pyogenes* в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл. На 19 сутки опухолевого роста измеряли размер опухоли (через 10 суток после начала лечения).

Проведено исследование цитотоксической активности всех штаммов в отношении клеток гепатомы 22a *in vitro*, которое показало наличие цитотоксической активности у штамма «Гуров». Однако выживаемость мышей с гепатомой 22a при введении штамма «Гуров» была очень низкой. В связи с этим для снижения вирулентности штамма «Гуров» нами было принято решение сконструировать штамм *S. pyogenes*, лишенный М-белка, как одного из основных факторов вирулентности.

**Создание штамма *S. pyogenes* «Гуров» с инактивированным геном М-белка.** Изогенный мутант штамма «Гуров» был получен с использованием интегративной плазмиды, введенной в кодирующую последовательность гена М-белка. Клон с интегрированной плазмидой был маркирован за счет введения

гена устойчивости к эритромицину в область структурной части *emt* гена. Интеграция носила стабильный характер. Анализ серологических свойств полученного мутантного штамма с использованием набора “Аквапаст” (Россия) выявил, что штамм сохранил групповую принадлежность. Достоверность полученного клона подтверждена методом ПЦР и секвенированием генома штамма «Гуров» в участке интеграции плазмиды. В дальнейшей работе этот штамм обозначается как «Гуров» *emt*<sup>-</sup> (GURSA1).

**Результаты полногеномного секвенирования штамма «Гуров» и его мутанта по М-белку «Гуров» *emt*<sup>-</sup> (GURSA1).** До проведения настоящих исследований серотип М-белка и наличие генов патогенности штамма «Гуров» были неизвестны. С использованием данных GenBank и в результате проведения полногеномного секвенирования установлено, что штамм «Гуров» принадлежит к серотипу M111. По результатам полногеномного секвенирования нам удалось установить, что размер генома штамма «Гуров» составляет 1 890 357 bp. Он содержит 6 рибосомальных оперонов РНК и 67 генов Т-РНК.

При секвенировании генома штамма «Гуров» было выявлено необычное строение Mga-регулона данного штамма (Рис. 2), которое заключалось в том, что этот регулон, который у многих штаммов стрептококков группы А содержит гены, кодирующие синтез трех М-подобных белков (*mrp*, *emt* и *enn*), имеет нарушение открытой рамки считывания в области гена *mrp*, прилежащего к гену позитивного транскрипционного регулятора Mga. В результате образования стоп кодона в открытой рамке считывания *mrp1* полноразмерный белок Mrp не может синтезироваться, а отсутствие характерной области прикрепления М-подобных белков к клеточной стенке в данном укороченном белке не позволяет рассчитывать на появление данного белка на поверхности стрептококка. При этом гены двух других белков, кодируемых генами *emt* и *enn* сохранены, что позволяет предполагать экспонирование белков Emm и Enn на поверхности бактерий.

Помимо необычного Mga-регулона, анализ генома позволил установить наличие в его структуре пяти умеренных бактериофагов и целой серии эритрогенных токсинов, относящихся к суперантигенам SpeJ, SmeZ, SpeG, SpeI, SpeH и SpeK.

Сравнение результатов секвенирования исходного штамма «Гуров» и «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1), как и ожидалось, показало наличие встроенной



Рис. 2. Схема строения Mga-регулона *S. pyogenes* M111 серотипа, штамм «Гуров». Желтыми стрелками обозначены открытые рамки считывания.

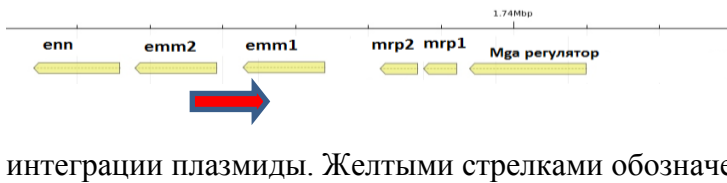


Рис. 3. Схема строения Mga-регулона *S. pyogenes* M111 серотипа, штамм «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1). Красной стрелкой обозначена область интеграции плазмиды. Желтыми стрелками обозначены открытые рамки считывания.

плазмиды в область *emm* гена, единственной копии на геном, которая не нарушает целостность генома в других областях. Инактивация гена *emm* за счет встройки плазмиды привела к неспособности синтезировать полноразмерный ген M-белка и практически исключила способность стимулировать экспрессию гена *emm* (Рис.3).

**Противоопухолевая активность исходного и полученного штаммов в экспериментах *in vivo*.** При двукратном внутриопухолевом введении животным с гепатомой 22а и саркомой S37 штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) на 10 сутки после начала лечения наблюдали задержку опухолевого роста, как по отношению к контрольной группе без бактерий, так и в отношении группы животных, которым вводили исходный штамм «Гуров» (Рис. 4 а, б).

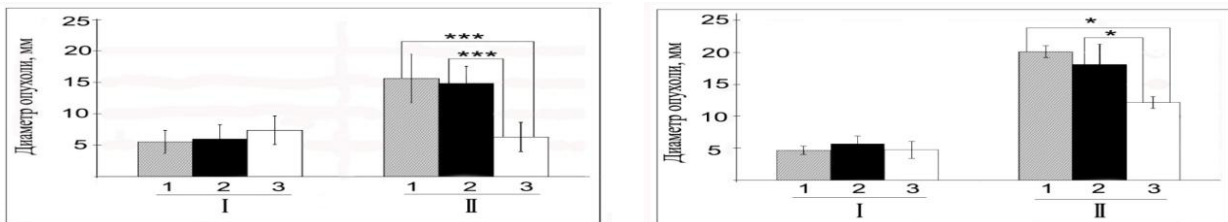


Рис. 4. Влияние внутриопухолевого введения *S. pyogenes* на размер опухолей мышей с гепатомой 22а (а) и саркомой S37 (б). По оси ординат: средний диаметр опухоли, мм. По оси абсцисс: I - размер опухоли до начала введения бактерий; II - размер опухоли через 10 дней после начала лечения; 1 - группа контрольных мышей, получавших внутриопухолевое введение физиологического раствора, 2 - животные, получавшие внутриопухолевое введение *S. pyogenes* «Гуров», 3 - *S. pyogenes* «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1). Достоверность различий между группами: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Выживаемость мышей при введении штамма «Гуров» *emt*<sup>-</sup> (GURSA1) была достоверна выше по сравнению с контрольной группой и с группой животных, которым вводили исходный штамм «Гуров» при росте гепатомы 22a (Рис. 5 а) и не изменялась при росте саркомы S37 (Рис. 5 б).

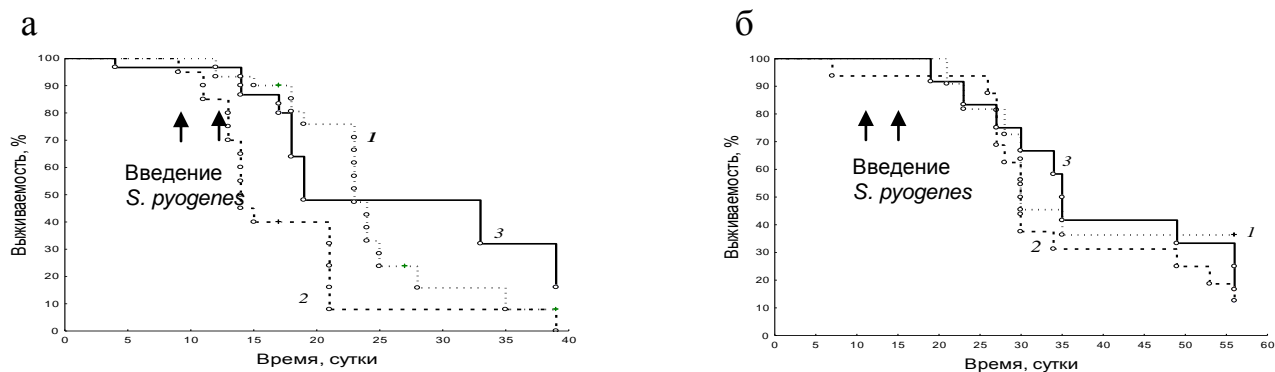


Рис. 5. Влияние внутриопухолевого введения *S. pyogenes* на выживаемость мышей с гепатомой 22a (а) и саркомой S37 (б); 1 - группа контрольных мышей, получавших внутриопухолевое введение физиологического раствора, 2 - животные, получавшие внутриопухолевое введение *S. pyogenes* «Гуров», 3 - *S. pyogenes* «Гуров» *emt*<sup>-</sup> (GURSA1). Достоверность различий по критерию Гехана при росте гепатомы 22a (а): между 1 и 2  $p < 0,001$ , между 2 и 3  $p < 0,01$ , между 1 и 3 не достоверно. При росте саркомы S37 (б) различия не достоверны. Медиана выживаемости (а): 1 - 24, 2 - 14, 3 - 34 суток; (б): 1 - 40, 2 - 40, 3 - 54 суток.

Для оценки жизнеспособности стрептококков внутри опухоли, сохранности мутации во введенных штаммах и степени распространении инфекции в организме производили высевы стрептококков из опухолей и селезенок мышей. Показано, что через 6 часов и 24 часа после первого и второго введения бактерий в опухоль (саркома S37) наблюдается сохранение жизнеспособности бактерий и наличия мутации; при этом высевы из селезёнок оставались отрицательными. Таким образом, оба штамма сохраняли жизнеспособность внутри опухоли мышей, не инфицируя другие органы животных и не теряя свои исходные свойства.

**Оценка цитотоксического действия штаммов «Гуров» и «Гуров» *emt*<sup>-</sup> в отношении клеток гепатомы 22a.** Выявленные нами межштаммовые различия по задержке роста опухоли и выживаемости мышей с гепатомой 22a поставили вопрос о том, не обладает ли штамм «Гуров» *emt*<sup>-</sup> (GURSA1) более выраженным прямым цитотоксическим эффектом в отношении клеток опухоли. Для проверки этого предположения клетки гепатомы 22a культивировали совместно с живыми бактериями в течение 4 часов. Установлено, что штамм

«Гуров»  $emm^-$  (GURSA1) оказывал более выраженное цитотоксическое действие в отношении клеток гепатомы 22a по сравнению с исходным штаммом «Гуров» во всех использованных нами концентрациях, приводя к деградации монослоя на 28%, а в высоких концентрациях на 60%.

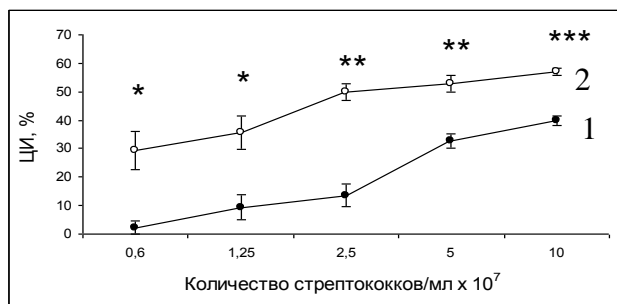


Рис. 6. Оценка цитотоксической активности *S. pyogenes* в отношении клеток гепатомы 22a *in vitro*. Клетки гепатомы 22a инкубировали с *S. pyogenes* в разных соотношениях в течение 4 часов. По оси абсцисс: концентрация *S. pyogenes*, число бактерий/мл (n=11). По оси ординат: цитотоксический индекс (ЦИ) - процент клеток, сохранивших жизнеспособность по отношению к контролю без *S. pyogenes*. 1 - *S. pyogenes* штамм «Гуров»; 2 - *S. pyogenes* штамм «Гуров»  $emm^-$  (GURSA1). Достоверность различий между

группами: \* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\* p<0, 001.

**Оценка адгезии штаммов «Гуров» и «Гуров»  $emm^-$  (GURSA1) в отношении клеток гепатомы 22a.** Начальным этапом цитотоксического действия многих микроорганизмов является этап их прикрепления к клеткам хозяина. Известно, что М-белки *S. pyogenes* в зависимости от серотипа и клеток-мишеней могут по-разному влиять на этот процесс. Белок М111 в отношении его адгезивных свойств ранее не изучался. Результаты изучения адгезии к клеткам гепатомы 22a *in vitro* продемонстрировали более высокую адгезионную способность штамма «Гуров»  $emm^-$  (GURSA1) по сравнению с исходным штаммом «Гуров» (Рис.7)

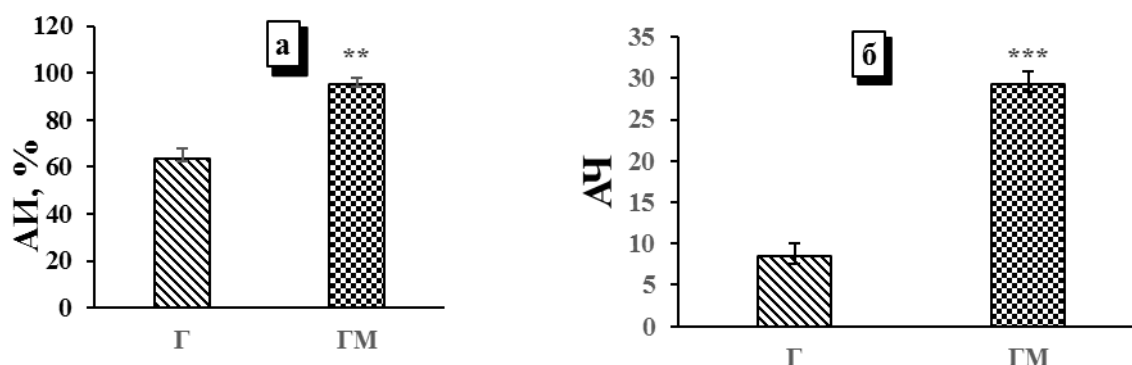


Рис.7. Адгезия *S. pyogenes* к клеткам гепатомы 22a *in vitro*. Пор оси ординат: (а) - количество инфицированных стрептококками макрофагов на 100 клеток, индекс адгезии (АИ), б - среднее количество бактерий, адгезировавших на одной клетке гепатомы 22a (АЧ); по оси абсцисс: Г – штамм «Гуров»; ГМ - штамм «Гуров»  $emm^-$  (GURSA1); n=6. Достоверность различий между группами: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

### Взаимодействие штамма «Гуров» и его мутанта по М-белку с перитонеальными макрофагами интактных мышей *in vitro*.

Модифицированный штамм *S. pyogenes* обладает прямым цитотоксическим действием в отношении опухолевых клеток *in vitro*, что продемонстрировано в экспериментах по адгезии и оценке цитотоксичности. Вместе с тем, противоопухолевый эффект штамма «Гуров»  $emm^-$  может также быть результатом не только прямого цитотоксического действия, но также и влияния бактерий на клетки иммунной системы и, в частности, связан с повышением противоопухолевой активности макрофагов. Задачей данного раздела работы было изучение влияния исходного штамма «Гуров» и его мутанта, лишённого М-белка, на функциональную активность макрофагов при их совместном культивировании с живыми бактериями. Для этого оценивали свойства макрофагов, имеющие отношение к противоопухолевой защите, а именно, продукцию нитроксид и супероксид анионов, а также ряда цитокинов. Однако, прежде чем перейти к изучению иммуномодулирующих свойств стрептококков, мы сочли необходимым исследовать фагоцитоз этих двух штаммов макрофагами, поскольку разная степень захвата бактерий могла существенным образом влиять на активацию фагоцитов.

Показано, что при инкубации КПЭ с бактериями фагоцитарное число (ФЧ) и фагоцитарный индекс (ФИ) были выше у мутантного штамма по сравнению с исходным, что указывает на анти-фагоцитарную роль белка M111 на стадии захвата бактерий (Рис.8).

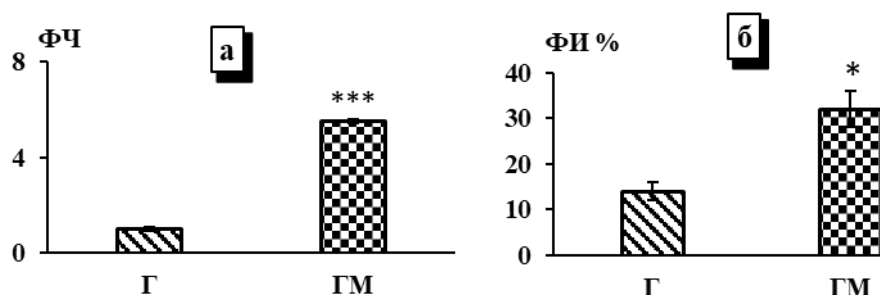


Рис. 8. Фагоцитоз *S. pyogenes* перитонеальными макрофагами. По оси ординат: а – фагоцитарное число - число поглощенных бактерий на один фагоцит; б – фагоцитарный индекс - процент фагоцитировавших клеток. По оси абсцисс: Г – *S. pyogenes* штамм «Гуров»; ГМ – *S. pyogenes* штамм «Гуров»  $emm^-$  (GURSA1); в каждой группе n=8. Достоверность различий между группами: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Влияние штамма «Гуров» и его мутанта по М-белку на способность макрофагов интактных мышей продуцировать нитроксид и супероксид анионы *in vitro*.** Известно, что окись азота (NO) и супероксид анионы являются важными медиаторами не только микробицидной функции макрофагов, но также и их цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток [Hafeman and Lucas, 1979]. При исследовании продукции нитритов разница между штаммами не обнаружена. Оба штамма *S. pyogenes*, как исходный, так и лишенный М-белка, в одинаковой мере стимулировали продукцию нитритов *in vitro*.

При культивировании КПЭ в присутствии бактерий было выявлено, что штамм «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) стимулировал продукцию супероксид анионов перитонеальными макрофагами в отличие от исходного штамма «Гуров» (Рис. 9).

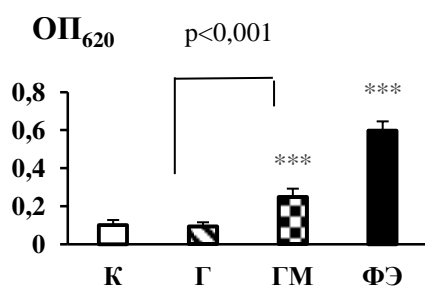


Рис. 9. Влияние *S. pyogenes* на восстановление НСТ клетками перитонеального экссудата (КПЭ). КПЭ инкубировали с бактериями в течение 24 ч в соотношении 1:3 бактерии/КПЭ. По оси ординат: оптическая плотность при длине волны 620 нм; по оси абсцисс: К – контроль, Г – инкубация КПЭ в присутствии *S. pyogenes* штамма «Гуров»; ГМ – инкубация КПЭ в присутствии *S. pyogenes* штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1), ФЭ – 1 мкг/мл форболового эфира; в каждой группе n=12. Достоверность различий между группами \*p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Можно предположить, что показанная нами способность штамма *S. pyogenes* «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) стимулировать продукцию активных форм кислорода в макрофагах интактных мышей *in vitro* проявляется также и в организме животных, что способствует элиминации опухолевых клеток.

**Влияние штамма «Гуров» и его мутанта по М-белку на способность макрофагов интактных мышей продуцировать цитокины *in vitro*.** Для исследования нами были выбраны два провоспалительных - IL-6 и IL-17 и один противовоспалительный - IL-10 цитокины. В настоящее время все три цитокина рассматриваются в качестве протуморогенных факторов, синтез которых в организме является нежелательным [Landskron, 2014]. Соответственно действия, направленные на подавление этих цитокинов будут играть положительную роль в организме опухоленосителей.

Мы не обнаружили разницы между влиянием исходного штамма «Гуров» и его изогенного мутанта на продукцию IL-6, однако выявили выраженные различия в продукции двух других цитокинов. Так, исходный штамм «Гуров» активировал продукцию IL-10 в значительно большей степени, чем штамм «Гуров» *emm*<sup>-</sup>, что позволяет связать наличие белка M111 со способностью индуцировать продукцию этого противовоспалительного цитокина макрофагами (Рис.10). По данным литературы IL-10 проявляет в основном негативные эффекты в отношении противоопухолевой защиты. С этой точки зрения, ослабление способности индуцировать синтез этого цитокина макрофагами путем удаления M111 белка может служить благоприятным фактором для развития противоопухолевой защиты и задержки опухолевого роста.

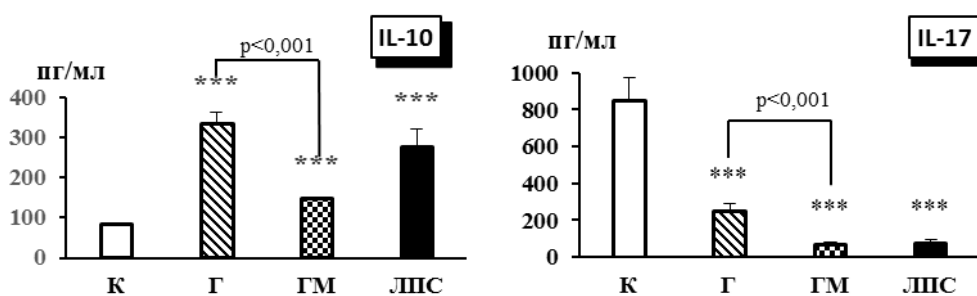


Рис. 10. Влияние *S. pyogenes* на продукцию цитокинов клетками перитонеального экссудата (КПЭ). КПЭ инкубировали с бактериями в течение 24 ч в соотношении 1:3 бактерии/КПЭ. По оси ординат: концентрация цитокинов, пг/мл; по оси абсцисс: К – контроль, Г – инкубация КПЭ в присутствии *S. pyogenes* штамма «Гуров»; ГМ – инкубация КПЭ в присутствии *S. pyogenes* штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1), ЛПС – инкубация КПЭ в присутствии 1 мкг/мл липополисахарида *E. coli*; в каждой группе n=8. Достоверность различий между группами: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Что касается продукции IL-17, то оба исследованных нами штамма оказались способными подавлять продукцию этого цитокина (Рис. 10), однако мутантный штамм «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) был способен подавлять продукцию IL-17 в значительно большей степени, чем исходный штамм «Гуров». Эту способность мутантного штамма можно также рассматривать как позитивный эффект в отношении противоопухолевой защиты, поскольку это будет приводить к снижению продукции проангиогенного и протуморогенного цитокина.

**Изучение противоопухолевого действия штамма *S. pyogenes* M49-16 и его мутанта с инактивированным геном аргининдеиминазы M49-16delA.** Поскольку из литературы известно, что фермент стрептококков аргининдеиминаза обладает выраженным противоопухолевым эффектом путем связывания аргинина, необходимого для клеточной пролиферации, мы поставили задачу подтвердить противоопухолевое действие этого фермента путем создания изогенного мутанта, лишённого аргининдеиминазы. Для создания мутанта нами был выбран штамм №16 *S. pyogenes* M49 серотипа, который оказывал выраженный ингибирующий эффект в отношении роста мышинной гепатомы 22a *in vivo*. Изогенный мутант по аргининдеиминазе *S. pyogenes* M49 серотипа был любезно предоставлен Карасевой А.Б. (отдел молекулярной микробиологии ФГБНУ “ИЭМ”). Исследование цитотоксического действия стрептококков в отношении клеток гепатомы 22a *in vitro* проводили в системе xCELLigence. Клеточный индекс, зарегистрированный на монослое клеток гепатомы 22a, снижался после внесения в среду стрептококков обоих штаммов (начиная с 5 часа). Снижение клеточного индекса происходило медленнее при воздействии дефектных по аргининдеиминазе *S. pyogenes* M49-16delAD по сравнению с исходным штаммом M49-16.

Кроме того, показано, что введение исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 внутрь опухоли замедляло рост саркомы S37 по сравнению с контрольной группой животных. Однако данный эффект не был обнаружен в группе мышей, которым вводились стрептококки, не продуцирующие аргининдеиминазу - M49-16delAD. Также было установлено, что при введении стрептококков исходного штамма M49-16 выживаемость мышей была существенно выше как по сравнению с группой животных, которым вводился мутантный штамм, что подтверждается анализом данных с применением критериев Кокса ( $p=0,002$ ) и Гехана ( $p=0,014$ ), так и по сравнению с группой контрольных животных.

Полученные результаты позволяют предположить, что аргининдеиминаза является существенным элементом в сложном механизме противоопухолевого действия стрептококков. Многие виды опухолей человека имеют повышенную потребность в аргинине и их рост зависит от этой аминокислоты. Это делает

препараты, препятствующие утилизации аргинина опухолевыми клетками, и в частности, аргининдеиминазу стрептококков, перспективными с точки зрения разработки новых противоопухолевых средств.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для проведения экспериментов по изучению противоопухолевой активности живых *S. pyogenes* в работе был впервые получен и охарактеризован штамм *S. pyogenes* «Гуров» M111 серотипа с инактивированным М-белком - «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1). Достоверность полученного клона была подтверждена методом ПЦР, секвенированием генома в участке интеграции плазмиды, а потом и полногеномным секвенированием как исходного штамма «Гуров», так и его эритромицин-устойчивого варианта с интеграцией плазмиды в область гена *emm*. Показано, что интеграция носит стабильный характер, а полученный штамм сохраняет групповую принадлежность.

При исследовании противоопухолевой активности мутантного *emm*<sup>-</sup> штамма мы наблюдали сдерживание опухолевого роста как по отношению к контрольной группе, так и в отношении группы животных, которым вводили исходный штамм «Гуров» на обеих использованных экспериментальных моделях. При этом выживаемость мышей при введении штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) была достоверна выше по сравнению с контрольной группой и с группой животных, которым вводили исходный штамм «Гуров», только при росте гепатомы 22а и не изменялась при росте саркомы S37.

При изучении возможного механизма противоопухолевого действия мутантного штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) показано, что он обладает более выраженным прямым цитотоксическим эффектом по сравнению с исходным штаммом в отношении клеток гепатомы 22а *in vitro*. Возможно, это было связано с увеличением адгезивной способности мутантного штамма в отношении этих клеток. В нашей работе впервые показано, что белок M111 обладает не только анти-адгезивными свойствами в отношении клеток гепатомы 22а, но также и анти-фагоцитарными – в отношении резидентных перитонеальных макрофагов.

Также нами была проверена возможность непрямого противоопухолевого

действия штамма *S. pyogenes* «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1), связанная с иммуномодулирующим воздействием на макрофаги. Показано, что удаление М-белка в штамме *S. pyogenes* «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) приводит к следующим иммуномодулирующим эффектам в отношении макрофагов: усилению продукции супероксид анионов и снижению продукции IL-10 и IL-17. Все три эффекта можно рассматривать как позитивные с точки зрения противоопухолевой защиты. Усиление продукции супероксид анионов может способствовать цитотоксическому действию макрофагов в отношении опухолевых клеток; подавление продукции ангиогенного цитокина IL-17 может сдерживать рост опухолевого узла, а снижение (по сравнению с исходным штаммом) продукции IL-10 уменьшит его иммунодепрессивное влияние.

Можно предположить, что данные эффекты являются одним из механизмов противоопухолевого действия штамма *S. pyogenes* «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) в организме мышей-опухоленосителей, а наблюдаемая нами при введении мутантного штамма задержка опухолевого роста может быть связана не только с его прямым цитотоксическим воздействием на опухолевые клетки, но и с его иммуномодулирующим действием, а именно, влиянием на функциональную активность внутриопухолевых макрофагов.

Таким образом, полученный нами штамм *S. pyogenes* «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) оказывает выраженный противоопухолевый эффект и может быть использован для последующего изучения механизмов его действия. На основании полученных данных может в дальнейшем разрабатываться новая стратегия противораковой терапии, связанная с применением живых модифицированных *S. pyogenes* с инактивированными генами вирулентности.

## ВЫВОДЫ

1. С помощью инсерционного мутагенеза получен и охарактеризован новый штамм *S. pyogenes* с инактивированным геном М-белка - «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1).
2. С помощью полногеномного секвенирования штамма *S. pyogenes* «Гуров» и его мутанта «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) показано, что инактивация гена М-белка произошла в результате встройки интегративной плазмиды в область гена *emm* в единственной копии на геном и не нарушает целостность генома в других областях.
3. Внутритропухолевое введение штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) вызывает задержку роста перевиваемых опухолей гепатомы 22а ( $p < 0,001$ ) и саркомы S37 у мышей ( $p < 0,05$ ) и повышает выживаемость животных с гепатомой 22а по сравнению с введением исходного штамма «Гуров» (по критерию Гехана  $p < 0,01$ ).
4. Штамм «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) оказывает более выраженное прямое цитотоксическое действие ( $p < 0,001$ ) и более высокую адгезивную способность ( $p < 0,001$ ) в отношении клеток гепатомы 22а *in vitro* по сравнению с исходным штаммом «Гуров».
5. Добавление штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1) в культуру перитонеальных макрофагов интактных мышей повышает противоопухолевую активность этих клеток – стимулирует в них образование активных форм кислорода и уменьшает продукцию ими протуморогенных цитокинов IL-10, IL-17 по сравнению с исходным штаммом «Гуров».
6. Инактивация гена аргининдеиминазы в штамме *S. pyogenes* M49-16 вызывает снижение противоопухолевого эффекта по сравнению с исходным штаммом в отношении клеток гепатомы 22а *in vitro* и перевиваемой саркомы S37 *in vivo*.
7. Комплекс приведенных данных расшифровывает патофизиологические и микробиологические основы противоопухолевого действия живых *S. pyogenes* штамма «Гуров» *emm*<sup>-</sup> (GURSA1), обусловленные характером их взаимодействия с клетками опухоли и с системой врожденного иммунитета, что обосновывает перспективность создания новых препаратов для терапии опухолей.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

### Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Суворова М.А., Крамская Т.А., Дуплик Н.В., Черешнев В.А., Грабовская К.Б., Ермоленко Е.И., Суворов А.Н., Киселева Е.П. Влияние инактивации гена М-белка на противоопухолевые свойства живых *Streptococcus pyogenes* в эксперименте //Вопросы онкологии. - 2017. - Т.63, №5. - С. 65-69.
2. Суворова М.А., Крамская Т.А., Суворов А.Н., Киселева Е.П. Инактивация гена белка M111 влияет на взаимодействие *Streptococcus pyogenes* с макрофагами мышей *in vitro* //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2017. - Т.164, №9. - С.330-334.
3. Суворова М.А., Цапиева А. Н., Дуплик Н. В., Крамская Т. А., Грабовская К. Б., Киселёва Е. П., Черешнев В. А., Суворов А. Н. Конструирование штамма стрептококка, мутантного по М-белку //Медицинский академический журнал. - 2016. - Т.16, №4. - С.235-236.
4. Суворова М.А., Крамская Т.А., Карасева А.Б., Мухин В.Н., Ермоленко Е.И., Суворов А.Н. Инактивация гена аргининдеиминазы стрептококков снижает степень их противоопухолевой активности *in vitro* и *in vivo* //Медицинский академический журнал. - 2017. - Т.17, №1. - С.96-101.

### Зарубежные публикации:

Suvorova M., Tsapieva A., Bak E, Chereshnev V., Kiseleva E., Suvorov A., Arumugam M. Complete genome sequences of *emm111* type *Streptococcus pyogenes* strain GUR with anti-tumor activity and it's derivate strain GURSA1 with inactivated *emm* gene //Genome Announcements. - 2017. - Vol. 5, Issue 38. - e00939-17. doi:10.1128/genomeA.00939-17.

### Тезисы докладов:

1. Суворова М.А., Потатуева О.О., Киселева Е.П. Цитотоксическое действие штаммов стрептококков группы А серотипа М49 на гепатому 22а мышей. Медицинская иммунология. 2011. Т.13 № 4-5, С.335-336.
2. Suvorova M., Potatueva O., Kiseleva E. Cytotoxic effect of group A streptococci on murine hepatoma 22a. Abstract Conf.: "Current diagnostics and therapeutic dilemmas in clinical management of group A streptococcal infections". 21-23 March 2013, Rome, Italy, p. 119.
3. Suvorova M., Puzyreva V., Tsapieva A., Suvorov A., Kiseleva E. Antitumor activity of M- protein mutant *Streptococcus pyogenes* strains on transplantable murine hepatoma 22a. Abstr. XIX Lancefield symposium on streptococci and streptococcal diseases, Buenos-Aires, Argentina, 9-12 November 2014, p.262.

4. Suvorova M., Tcapieva A., Suvorov A., Kiseleva E. The influence of live *Streptococcus pyogenes* on the growth of solid tumors. Eur. J. Cancer, suppl., 2015. Abstr. The EMBO workshop “Cellular and molecular mechanisms of tumor microenvironment”, 9-12 July 2015, Tomsk, Russia, p.1542.
5. Суворова М.А. Влияние живых стрептококков группы А на рост экспериментальных опухолей у мышей. Медицинская иммунология. - 2015. Т.17, №3. С. 164.
6. Suvorova M., Suvorov A., Kiseleva E. *Streptococcus pyogenes* M-protein mutant strain as live vaccine for cancer treatment. Abstr. 26<sup>th</sup> ECCMID, 2-12 April 2016 #4997, Amsterdam, Netherlands.
7. Суворова М.А., Крамская Т.А., Цапиева А.Н., Киселева Е.П. Влияние стрептококков группы А на рост мышечной гепатомы 22А in vitro Тез. II Петербургского онкологического форума «Белые ночи». 2016, Санкт-Петербург. С.356-357.
8. Суворова М.А., Крамская Т.А., Киселева Е.П. Изучение механизма противоопухолевого действия штамма *Streptococcus pyogenes*, мутантного по М-белку. Тез. III Петербургского онкологического форума «Белые ночи 2017». 2017, Санкт-Петербург. С.63-64.