

Зонов Евгений Владимирович

**Механизмы онколитического действия
рекомбинантного апоптин-продуцирующего
вируса осповакцины**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических
наук**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, группе микроскопических исследований

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

**Рябчикова
Елена Ивановна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией ультраструктурных
исследований «Научно-исследовательский
институт клинической и экспериментальной
лимфологии» - филиал ИЦиГ СО РАН, г.
Новосибирск

**Бгатова
Наталья Петровна**

доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией цитологии и
клеточной биологии ФГБНУ «Институт
молекулярной патологии и патоморфологии»
г. Новосибирск

**Лушниковая
Елена Леонидовна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «___» _____ 2017 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева,10 Тел: +7(383) 363-49-06*1321, факс:
(1) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Онкологические заболевания в настоящее время являются одной из основных причин смертности в развитых странах, что определяет актуальность разработки новых способов и средств лечения. Современные схемы лечения онкологических заболеваний, как правило, основаны на химиотерапевтическом воздействии на опухолевую ткань, которое дополняют радиотерапией и хирургическим удалением опухолевых узлов. Ни одна из существующих схем не гарантирует полного излечения, эффективность лечения онкологических заболеваний определяется увеличением продолжительности жизни пациента (D'Errico et al., 2017; Urruticoechea et al., 2010). Серьезной проблемой применения химиотерапевтических методов являются побочные эффекты, значительно осложняющие лечение опухолевых заболеваний (Delaney et al., 2005; Staff et al., 2017). Методы лечения, находящиеся на стадии разработки, направлены, в первую очередь, на адресную доставку терапевтического агента к опухолевым клеткам, «персонализацию» схемы лечения, а также на нивелирование побочных эффектов. Перспективными подходами к лечению опухолевых заболеваний считаются иммунотерапия, увеличение селективности доставки препаратов в ткань опухоли с помощью наночастиц и виротерапия (Franks et al., 2012; Knepper et al., 2017).

Противоопухолевые свойства вирусов были обнаружены в первой половине XX века, когда впервые появились сообщения о случаях излечения больных раком при острых вирусных заболеваниях (Kelly et al., 2007). Вирусы, способные специфически уничтожать опухолевые клетки, получили название онколитических. С развитием генной инженерии появилась возможность получать рекомбинантные штаммы вирусов с требуемыми свойствами (Naik et al., 2009; Fukuhara et al., 2016). Геном онколитических вирусов изменяют, прежде всего, с целью усиления противоопухолевых свойств и снижения патогенности. Один из способов получения рекомбинантных штаммов - введение в геном вируса трансгенов, кодирующих белки, усиливающие проникновение вируса в ткань опухоли, увеличивающие время нахождения вируса в опухоли, стимулирующие иммунный противоопухолевый ответ или индуцирующие апоптоз опухолевых клеток (Hulou et al., 2016). Индукция апоптоза, естественного пути гибели клеток, является наиболее предпочтительным механизмом уничтожения опухоли (Tavassoli et al., 2005).

Поиск проапоптотических белков и встройка соответствующих трансгенов в геном онколитических вирусов – одно из наиболее перспективных и активно разрабатываемых направлений создания высокоэффективных средств противоопухолевой терапии. Белок апоптин, неструктурный белок вируса анемии цыплят, способен избирательно индуцировать апоптоз опухолевых клеток (Tavassoli et al., 2005; Los et al., 2009), что поставило его в ряд возможных эффективных трансгенов. В научной литературе описаны рекомбинантные апоптин-экспрессирующие штаммы на основе природных штаммов аденовируса, лентивируса, вируса

болезни Ньюкасла, вируса оспы кур (Los et al., 2009). Вирус осповакцины (ВОВ), представитель семейства *Poxviridae*, обладает рядом свойств, делающих его привлекательной основой для создания рекомбинантных онколитических штаммов. Так, ВОВ не интегрирует свои гены в геном хозяина, в свою очередь, его геном позволяет встроить около 20 тыс. пар нуклеотидов без снижения репродуктивных свойств вируса, вирус также имеет природные онколитические свойства (Кочнева и др., 2013). На основе штамма Л-ИВП ВОВ в ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, РФ) был создан рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ, обладающий сниженными патогенными свойствами вследствие делеции гена *C11R*, на место которого был встроен синтетический ген, кодирующий апоптин. Штамм VVdGF-ApoS24/2 показал повышенную литическую активность в отношении опухолевых клеток по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП *in vitro* (Кочнева и др., 2013). Анализ биологических свойств штамма VVdGF-ApoS24/2 говорит о перспективности его использования в качестве основы для создания противоопухолевого препарата, что определяет актуальность изучения механизмов его онколитического действия *in vivo*.

Цель исследования: изучить механизмы противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ на ксенографты карциномы А431 человека и мышиную карциному Эрлиха.

Задачи исследования:

1. Изучить морфологические характеристики репликации штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ в опухолевых клетках ксенографтов карциномы А431 человека и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей.
2. Оценить онколитический эффект штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ в сравнении с исходным штаммом Л-ИВП и установить морфологические эквиваленты его составляющих на ксенографтах карциномы А431 человека у мышей *nude* и трансплантатах карциномы Эрлиха мышей.
3. Изучить эффекты встройки трансгена апоптина в геном штамма Л-ИВП ВОВ *in vivo*, на экспериментальных моделях ксенографтов карциномы человека А431 и сингенной карциномы Эрлиха мышей.

Научная новизна. В работе впервые изучены механизмы противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ на ксенографты карциномы человека А431 у мышей *nude* и сингенную опухоль мышей (карциному Эрлиха). Впервые описаны морфологические характеристики репликации штамма VVdGF-ApoS24/2 в клетках карциномы А431 привитой иммунодефицитным мышам, и в клетках сингенной асцитной карциномы Эрлиха у иммунокомпетентных мышей, описана морфология ксенографтов и трансплантатов опухолей. Установлено усиление противоопухолевого эффекта штамма VVdGF-

АpoS24/2 по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП ВОВ, несмотря на его менее интенсивную репликацию. Впервые показано, что проапоптотический белок апоптин, экспрессирующийся в составе генома штамма VVdGF-АpoS24/2 ВОВ, не индуцирует процесс апоптоза клеток карциномы человека и асцитной карциномы мышей *in vivo*. Выявлено изменение морфологических характеристик гибели клеток, обусловленной введением штамма VVdGF-АpoS24/2, а именно: формирование крупных скоплений волокнистого материала на месте клеток, отсутствие экссудата и значимых количеств клеточного детрита.

Впервые обнаружено существование еще одного механизма противоопухолевого действия онколитических вирусов, который реализуется на модели сингенной опухоли (карцинома Эрлиха), привитой мышам, и не связан с разрушением опухолевых клеток ВОВ и действием эффекторных клеток иммунной системы, а также с разрушением кровеносных сосудов внутри опухоли. Введение штамма VVdGF-АpoS24/2 ВОВ приводило к «остановке» клеточного цикла опухолевых клеток в S-фазе и последующему уменьшению числа митозов опухолевых клеток и объема опухолей. Количество клеток, «замерших» в S-фазе клеточного цикла при введении штамма VVdGF-АpoS24/2, статистически значительно превышало таковое при введении штамма Л-ИВП, что, несомненно, связано со встройкой трансгена апоптина в геном штамма Л-ИВП ВОВ.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты данной работы дополняют существующие представления о механизмах противоопухолевого эффекта онколитических вирусов, в частности, апоптин-продуцирующих рекомбинантных штаммов. В работе показана принципиальная возможность получения отчетливого терапевтического эффекта онколитического вируса без вовлечения эффекторных клеток иммунной системы, что важно для разработки противоопухолевых препаратов для больных с явлениями иммунодефицита. Представленные в работе новые данные об эффектах встройки трансгена апоптина могут быть полезны при разработке новых противоопухолевых препаратов на основе онколитических вирусов. Все результаты работы имеют научно-практическое значение и используются при создании новых рекомбинантных онколитических вирусов в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, РФ).

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач были использованы методы, позволяющие получить полное представление о процессах деструкции ксенографтов карциномы А431 человека и трансплантатов сингенной карциномы Эрлиха у мышей после однократного интратуморального введения рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-АpoS24/2 ВОВ. Исследования проводились на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Основные методы исследования: электронная и световая микроскопия, иммуногистохимическое выявление маркеров апоптоза и клеточного цикла на парафиновых срезах, морфометрический анализ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Рекомбинантный штамм VVdGF-ApoS24/2 вируса осповакцины оказывает выраженный противоопухолевый эффект при однократном интратуморальном введении мышам с привитыми опухолевыми узлами человеческой и мышьиной карциномы.
2. Противоопухолевый эффект рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 вируса осповакцины определяется действием апоптина, экспрессируемого в составе его генома, и природной способностью вируса к лизису опухолевых клеток.
3. Механизм противоопухолевого действия апоптина, экспрессируемого в составе генома рекомбинантного штамма вируса осповакцины, связан с его способностью индуцировать накопление филаментов цитоскелета и приводить к «аресту» клеточного цикла опухолевых клеток в S-фазе.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов обеспечивается выполнением работы на высоком экспериментально-методическом уровне с применением методов световой и электронной микроскопии, иммуногистохимического выявления белков на парафиновых срезах, а также достаточным объемом экспериментального материала. Методы исследования адекватны поставленным задачам. Иллюстративный материал высокого качества и представлен в достаточном объеме.

Материалы диссертации были представлены на всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013) и «Симбиоз-Россия 2015» (Новосибирск, 2015), на I международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio (Новосибирск, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Личное участие автора. Светооптическое и ультраструктурное исследование образцов, иммуногистохимическое выявление антигенов на парафиновых срезах, морфометрия, а также эксперименты с карциномой Эрлиха выполнены автором лично.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», содержит «Выводы» и «Список литературы», включающий 149 публикаций. Работа изложена на 109 страницах, содержит 18 рисунков и 2 таблицы.

Благодарности. Автор искренне благодарит д.б.н. Кочневу Г.В. и к.м.н. Гражданцеву А.А. за проведение эксперимента с карциномой А431 и введение вирусов, Таранова О.С. за проведение флуоресцентного исследования на культуре клеток карциномы А431.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии эпидермоидной карциномы A431 человека и фибробластов почек обезьян CV-1 были получены из АТСС (Маннасанс, Вирджиния, США). **Штамм Л-ИВП ВОВ** был получен из Государственной Коллекции возбудителей вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, РФ). **Апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2** был получен ранее путем встройки синтетического гена, кодирующего неструктурный белок вируса анемии цыплят апоптин, в геном штамма Л-ИВП ВОВ (Кочнева и др. 2013). Вирусы нарабатывали в клетках линии CV-1 и выделяли осаждением в градиенте сахарозы. Титр вирусов определяли методом бляшкообразующих единиц (БОЕ) на монослое клеток CV-1. Вирусные суспензии хранили в стерильном 0,9% растворе NaCl при -80°C, концентрация препарата 10⁹БОЕ/мл. **Животные и введение вируса.** Самкам мышей линии nude подкожно в левое бедро вводили 5×10⁶ клеток карциномы A431 человека на мышшь в 100 мкл стерильного 0,9% раствора NaCl, через 10 сут мышам однократно интратуморально вводили штамм VVdGF- ApoS24/2 ВОВ в дозе 2×10⁷БОЕ/мышшь в 100 мкл стерильного 0,9% раствора NaCl. Группа сравнения: мышши, в ксенографты которых однократно вводили исходный штамм Л-ИВП ВОВ в аналогичных дозе и объеме. Группа контроля: мышши, в ксенографты которых вводили 100 мкл 0,9% стерильного раствора NaCl. Рост опухолевых узлов фиксировали, измеряя длину и ширину узлов. Мышей выводили из эксперимента через 2, 4, 8, 36 и 55 сут после введения штаммов ВОВ, иссекали опухолевые узлы с окружающими тканями и фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на растворе Хенкса, для светооптического и ультраструктурного исследований.

Для получения узлов сингенной опухоли самцам мышшей линии C57Bl/6 подкожно вводили 13×10⁶ клеток мышшиной карциномы Эрлиха в 0,4 мл 0,9% стерильного раствора NaCl, через 7 сут мышам однократно интратуморально вводили ВОВ VVdGF-ApoS24/2 в дозе 1×10⁷ БОЕ/мышшь в 100 мкл 0,9% стерильного раствора NaCl. Мыши группы сравнения получали однократные интратуморальные инъекции штамма Л-ИВП в дозе 1×10⁷ БОЕ/мышшь в 100 мкл 0,9% стерильного раствора NaCl. Мышам контрольной группы вводили 100 мкл 0,9% стерильного раствора NaCl. Мышей выводили из эксперимента через 2, 4, 6, 8, 12 и 14 сут после введения ВОВ, иссекали опухолевые узлы и фиксировали в 4% растворе параформальдегида для микроскопических исследований.

Для получения асцитной формы сингенной опухоли самкам мышшей линии C57Bl/6 интраперитонеально вводили 3–3,5×10⁶ клеток карциномы Эрлиха в 0,2 мл 0,9% стерильного раствора NaCl, через 4 сут мышам однократно интраперитонеально вводили штамм VVdGF-ApoS24/2 в дозе 1,6×10⁷ БОЕ/мышшь в 100 мкл 0,9% стерильного раствора NaCl, мышам группы сравнения - штамм Л-ИВП ВОВ в аналогичных дозе и объеме. Группу контроля составляли мышши, получавшие однократное интраперитонеальное введение 100 мкл 0,9% стерильного раствора NaCl.

Мышей выводили из эксперимента через 3, 6, 9 и 10 сут после введения вируса, отбирали асцитическую жидкость, опухолевые клетки осаждали центрифугированием, промывали 0,9% раствором NaCl и фиксировали в 4% растворе параформальдегида для микроскопических исследований.

Светооптические и иммуногистохимические исследования. Для светооптического исследования образцы обезвоживали стандартным способом в серии растворов этанола нарастающей концентрации, изопропанолу и ксилолу, заливали в парафиновые блоки. С блоков изготавливали срезы толщиной 3,5 – 4 мкм. Для рутинного светооптического исследования срезы окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином и по методу пикро-Маллори, заключали под покровное стекло в среду Bio-Mount (Bio-Optica, Италия). Парафиновые срезы для иммуногистохимических реакций монтировали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизин (Thermo Fisher Scientific, США). Иммуногистохимические реакции с первичными антителами к белкам Ki-67, Araf-1, каспаза-3, CD3, CD11b (Abcam, Великобритания), PCNA (BioLegend, США) и аминокислотной последовательности FLAG (Santa-Cruz, США) проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Положительную реакцию с антителами визуализировали с помощью готового к использованию набора AEC Single Solution system (Abcam, Великобритания), затем срезы докрашивали гематоксилином Эрлиха и заключали под покровное стекло в глицерин-желатин.

Анализ морфологии опухолей и результатов иммуногистохимических реакций проводили на световом микроскопе Leica DM2500, снабженном цифровой камерой DFC420C (Leica, Германия). Подсчет опухолевых клеток в состоянии митоза и клеток с положительной реакцией с антителами проводили на снимках парафиновых срезов, полученных при увеличении объектива 40х. Подсчет охватывал не менее 200 клеток на не менее чем 5 снимках с одного образца, в целом – не менее 1000 клеток от одной мыши.

Ультроструктурное исследование. Образцы опухолевых узлов, фиксированные в 4% растворе параформальдегида, нарезали на кусочки толщиной 1-2 мм и дофиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия, приготовленном на растворе Хенкса, обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации и ацетоне, пропитывали в смеси 1 : 1 ацетона и смеси смол эпон-аралдит (SPI, США) в течение 12-14 ч, затем кусочки переносили в смесь смол с катализатором DMP-30 (SPI, США), выдерживали при комнатной температуре (2-3 ч) и при 44°C в течение 12 ч, после чего блоки полимеризовали при 53°C. С полученных блоков изготавливали полутонкие срезы толщиной 1-2 мкм с помощью ультрамикротомы EM UC7 (Leica, Германия) и после окраски азуром-2 изучали в световом микроскопе для выбора места заточки пирамидки для изготовления ультратонких срезов. Ультратонкие срезы толщиной 70-80 нм готовили с помощью ультрамикротомы EM UC7, контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца стандартным способом. Срезы изучали и получали электронограммы с помощью просвечивающего

электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония), оснащенного цифровой камерой бокового ввода Veleta (SIS, Германия). **Изучение изменений цитоскелета клеток карциномы A431 *in vitro*.** Монослой клеток A431 заражали штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB или штаммом Л-ИВП с множественностью 0,01 БОЕ/клетку, и инкубировали при 37°C в течение 24 и 48 ч. Клетки снимали, осаждали центрифугированием, фиксировали в 4% растворе параформальдегида и обрабатывали для ультраструктурного исследования как описано выше.

Для изучения клеток с помощью флуоресцентного микроскопа монослой клеток карциномы A431 выращивали на покровных стеклах и инфицировали штаммом VVdGF- ApoS24/2 BOB или штаммом Л-ИВП с множественностью 0,01 БОЕ/клетку, инкубировали при 37°C в течение 24 и 48 ч. Клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и фиксировали в 4% растворе параформальдегида, затем промывали ФСБ, обрабатывали 0,1% раствором тритона X-100 в ФСБ. Актиновые филаменты визуализировали с помощью TRITC-фаллоидина. Образцы трижды промывали ФСБ, заключали в 50% глицерин. Флуоресценцию TRITC-фаллоидина фиксировали с помощью микроскопа AxioImager Z1, оснащенного цифровой камерой AxioCam MR с фильтрами 02, 10, 15 (Zeiss, Германия). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения AxioVision 4 (Zeiss, Германия).

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA 8.0.360.0. Статистическую значимость различий в вирусологических исследованиях определяли с помощью критерия Манна-Уитни-Вилкоксона со значением $P < 0,05$, а при подсчете клеток - с помощью критерия Стьюдента, со значением $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучению эффекта онколитических вирусов посвящены десятки исследований, однако, в опубликованных работах не приводится сведений о структурных параметрах репродукции вирусов и механизмах их воздействия на опухолевые клетки. Между тем, понимание механизма действия любого лекарственного препарата требует детального изучения процессов, происходящих в клетках и тканях под его воздействием. Методы световой и электронной микроскопии позволяют не просто визуализировать развитие деструктивных процессов в опухолевой ткани, но и проанализировать морфологические эквиваленты протекающих в опухоли процессов, определив их механизмы.

В данном исследовании однократное интратуморальное введение штаммов BOB мышам приводило к значительному уменьшению размеров ксенографтов карциномы A431 по сравнению с мышами, получавшими инъекции 0,9% раствора NaCl (рис. 1 А, Б). На парафиновых срезах ксенографтов у мышей контрольной группы выделялись периферическая зона пролиферации клеток и зона их некротической гибели в центре ксенографта, занимавшая около 25% площади среза, независимо от времени

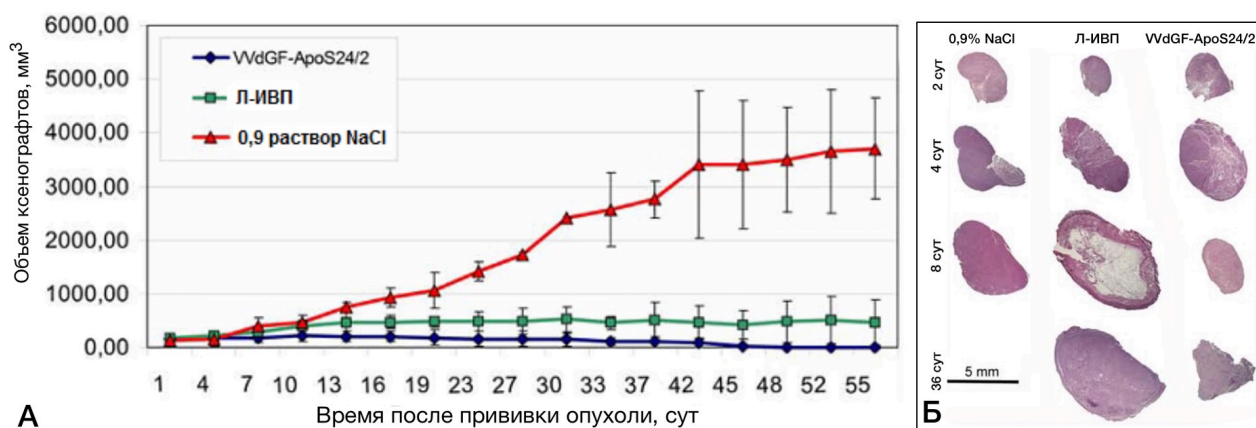


Рисунок 1. А - изменения объема ксенографтов карциномы А431, привитых мышам *nude*, после интратуморального введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ, и 0,9% раствора NaCl. Б – парафиновые срезы через ксенографты карциномы А431 в динамике эксперимента, максимальный размер. Окраска гематоксилином и эозином.

после прививки опухоли. Через 4 сут после введения штаммов ВОВ в ксенографты карциномы А431 зона некротической гибели клеток возрастала до 50% площади среза, а через 8 сут зона занимала всю площадь среза ксенографтов, тогда как после введения 0,9% раствора NaCl площадь зоны некроза не увеличивалась.

Ультраструктурное исследование ксенографтов карциномы А431 у мышей *nude* выявило репликацию обоих штаммов ВОВ в клетках карциномы через 2 и 4 сут после интратуморального введения. Зрелые и незрелые частицы ВОВ располагались в опухолевых клетках скоплениями величиной около 3 мкм (штамм VVdGF-ApoS24/2), и около 4 мкм (штамм Л-ИВП ВОВ). Содержание частиц ВОВ в ткани ксенографтов карциномы А431 возрастало до 8 сут после введения вируса в ксенографты, затем постепенно снижалось. Зараженные штаммами ВОВ клетки разрушались по мере накопления вирусного потомства, через 8 сут ксенографты были полностью заполнены смесью клеточного детрита, частиц и скоплений ВОВ (рис. 2).

Вирусологическое исследование показало, что штамм VVdGF-ApoS24/2 размножается с меньшей интенсивностью, чем штамм Л-ИВП, максимальный титр вирусов достигал $3,1 \times 10^8$ и $3,1 \times 10^9$ БОЕ/мл гомогената опухоли, соответственно. Это связано с аттенуацией рекомбинантного штамма вследствие делеции гена вирусного ростового фактора, в район которой встроен ген апоптина (Кочнева и др. 2013). Однако, несмотря на снижение репликативной активности, штамм VVdGF-ApoS24/2 показывал больший противоопухолевый эффект, чем штамм Л-ИВП: ксенографты исчезали практически полностью («усыхали») у основной части «леченных» мышей к 55-м сут наблюдения. При введении штамма Л-ИВП у всех мышей, на протяжении всего периода наблюдения, наблюдались отчетливые узелки на месте ксенографтов, выделяющие экссудат при разрезе.

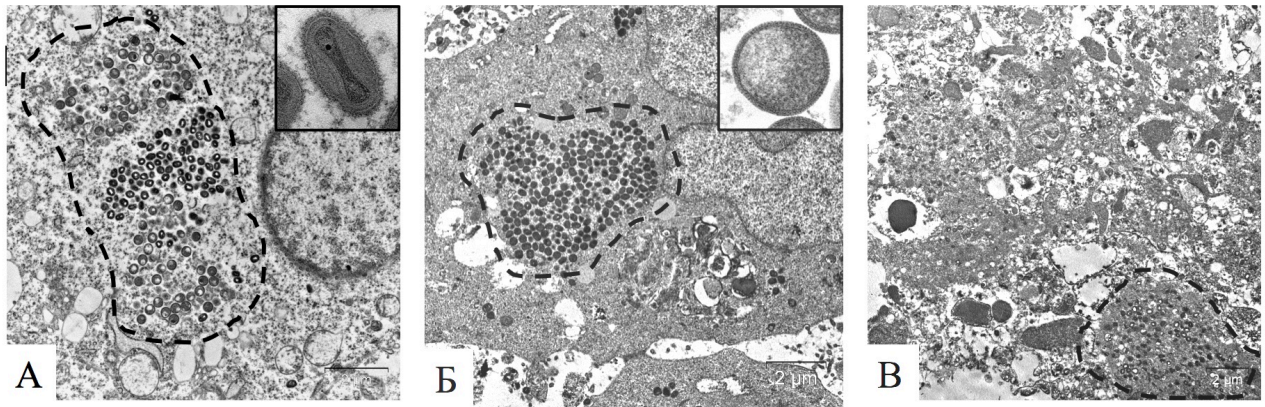


Рисунок 2. Ультратонкие срезы ксенографтов карциномы А431, привитых мышам *nude* через 2 (А, Б) и 8 (В) сут после интратуморального введения ВОВ. А - репродукция штамма Л-ИВП и Б – штамма VVdGF-ApoS24/2. На врезках: А - зрелый вирион штамма VVdGF-ApoS24/2, Б - незрелый вирион штамма Л-ИВП. В - “содержимое” ксенографта карциномы А431 после введения штамма VVdGF-ApoS24/2. Скопления вирионов обведены пунктирной линией.

На ультратонких срезах ксенографтов карциномы А431 через 8 сут после введения рекомбинантного и исходного штаммов ВОВ не удалось обнаружить ни одной опухолевой клетки, сохранившей свою целостность. Чтобы подтвердить отсутствие в ксенографтах клеток, способных к пролиферации, на парафиновых срезах иммуногистохимически выявляли белок Ki-67, который в клинической диагностике используют для выявления опухолевых клеток, находящихся в активной фазе клеточного цикла (Gerdes et al., 1984; Braun et al., 1988; Pezzilli et al., 2016). Через 8, 36 и 55 сут после введения ВОВ на парафиновых срезах ксенографтов отсутствовала позитивная реакция с анти-Ki-67 антителами, в отличие от срезов, полученных через 2 и 4 сут. На срезах ксенографтов мышей контрольной группы многочисленные Ki-67-позитивные клетки наблюдались на всем протяжении исследования.

Важным элементом исследования рекомбинантных вирусов является подтверждение экспрессии трансгена в опухолевых клетках. Чтобы проверить, экспрессируется ли апоптин рекомбинантным штаммом VVdGF-ApoS24/2, мы проводили его иммуногистохимическое выявление на парафиновых срезах ксенографтов карциномы А431. Отчетливое специфическое окрашивание, соответствующее локализации апоптоина, наблюдалось в цитоплазме клеток ксенографтов через 2 и 4 сут после введения штамма VVdGF-ApoS24/2. Следует отметить, что апоптин не выявлялся в ядрах клеток карциномы А431 (рис. 3), что имеет принципиальное значение, поскольку локализация апоптоина в ядре необходима для реализации его проапоптотического действия (Los et al., 2008). Мы изучили индукцию апоптоза в опухолевых клетках после введения штаммов ВОВ. Подсчет клеток, экспрессирующих маркеры апоптоза Аraf-1 и каспазу-3, на парафиновых срезах ксенографтов

карциномы А431 показал, что интратуморальное введение штаммов ВОВ приводит к более чем четырехкратному увеличению количества клеток в состоянии апоптоза по сравнению с введением 0,9% раствора NaCl. Экспрессия апоптоина не влияла на количество клеток карциномы, экспрессирующих маркеры апоптоза.

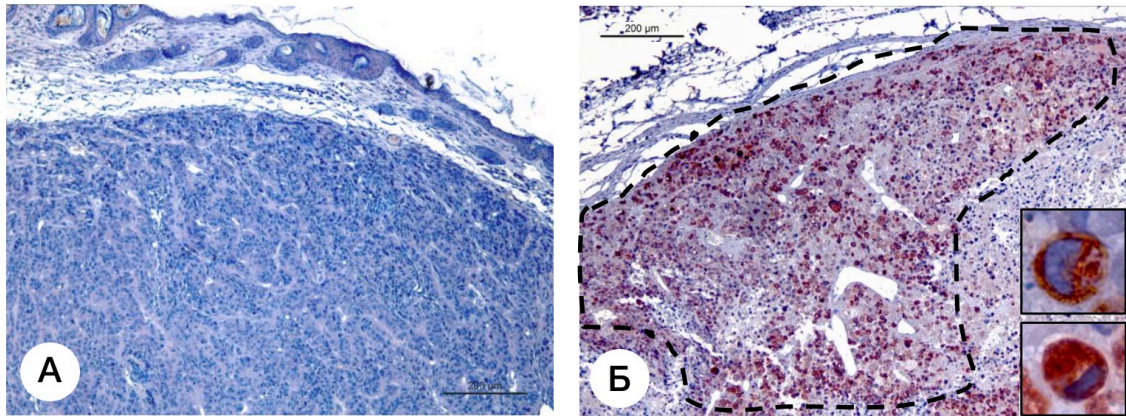


Рисунок 3. Парафиновые срезы ксенографтов карциномы А431, привитых мышам *nude*. Иммуногистохимическое выявление комплекса FLAG-апоптоин с помощью анти- FLAG антител. **А** – негативная реакция через 2 сут после интратуморального введения штамма Л-ИВП. **Б** – позитивная реакция через 2 сут после введения штамма VVdGF- ApoS24/2. Пунктирной линией обведены участки активной экспрессии апоптоина. На вставках: клетки с позитивно окрашенным анти-FLAG антителами материалом в цитоплазме, ядра клеток синего цвета. Визуализация антигена хромогеном АЕС, докраска гематоксилином.

Через 36 сут после интратуморального введения штамма VVdGF- ApoS24/2 мышам на ультратонких срезах ксенографтов карциномы А431 были обнаружены скопления волокнистого материала, по очертаниям сходные с опухолевыми клетками. Скопления практически замещали клетки, количество клеточного детрита на срезах было очень невелико.

Мы предположили, что в состав этих скоплений входят актиновые филаменты, нарушение их организации при репродукции ВОВ описано ранее (Ploubidou, Way, 2001; Rottner, Strada, 2009). Для проверки этого предположения актиновые филаменты выявляли с помощью TRITC-фаллоидина в культуре клеток карциномы А431, зараженных штаммом VVdGF- ApoS24/2, изучение препаратов с помощью флуоресцентного микроскопа выявило нарушение организации актиновых филаментов в цитоплазме (формирование скоплений) через 48 ч после заражения, штамм Л-ИВП формирования скоплений не вызывает. Ультраструктурное исследование клеток карциномы А431 *in vitro* выявило скопления актиновых филаментов, сходные с таковыми на срезах ксенографтов карциномы А431

после введения штамма VVdGF-ApoS24/2. Однако, скопления филаментов в ксенографтах существенно крупнее, что позволяет предположить присутствие в них и других структур цитоскелета, в частности, промежуточных филаментов. Очевидно, что встройка трансгена апоптина влияет на организацию цитоскелета клеток карциномы A431.

Мыши nude, которым подкожно прививали клетки человеческой карциномы A431 с целью формирования ксенографтов и последующего изучения противоопухолевого действия рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ, иммунодефицитны (Jin et al., 2010), что не позволяет изучить возможное влияние иммунной системы на процесс разрушения опухоли под действием штаммов ВОВ. Для более глубокого понимания механизмов противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 было проведено изучение его воздействия на мышиную карциному Эрлиха, которую прививали подкожно мышам линии C57Bl, имеющим интактную иммунную систему (Bavia et al., 2016).

Однократное интратуморальное введение штаммов ВОВ в опухолевые узлы карциномы Эрлиха приводило к значительному снижению размеров опухолевых узлов у мышей линии C57Bl. Однако, исследование парафиновых срезов не обнаружило ни усиления процессов некроза и апоптоза, ни признаков размножения ВОВ в клетках солидной карциномы Эрлиха. Электронно-микроскопический анализ также не обнаружил признаков размножения ВОВ в клетках опухоли. Иммуногистохимическое выявление моноцитов, гранулоцитов и Т-клеток на парафиновых срезах трансплантатов карциномы Эрлиха показало присутствие этих клеток в ткани карциномы. Однако, не было выявлено различий их количества и локализации между опытной группой, группой сравнения и контрольной. Это позволило исключить эффекторные реакции клеточного звена иммунной системы мышей из состава компонентов наблюдаемого противоопухолевого эффекта штаммов ВОВ в изучаемой экспериментальной системе.

Мы предположили, что причиной замедления роста опухолевых узлов карциномы Эрлиха может быть снижение пролиферативной активности клеток опухоли после интратуморального введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ. Отсутствие четких границ трансплантатов карциномы Эрлиха и распространение опухолевых клеток в мышечную ткань, их окружающую, сделали невозможным корректный подсчет количества опухолевых клеток в состоянии митоза на парафиновых срезах, полученных от мышей различных экспериментальных групп. Чтобы достичь необходимой точности подсчетов, дальнейшие эксперименты по изучению механизмов противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ проводили на асцитной форме карциномы Эрлиха, привитой в интраперитонеальную полость мышей линии C57Bl.

Асцитическая жидкость содержала большое количество опухолевых клеток, что позволило проводить светооптические, ультраструктурные и вирусологические исследования на одном и том же препарате. Ультраструктурное исследование осадков асцитической жидкости мышей,

получавших внутрибрюшинные инъекции штаммов ВОВ, обнаружило размножение обоих штаммов ВОВ в редких клетках асцитной карциномы Эрлиха (рис. 4). Оценка количества клеток, в которых размножается ВОВ, показала, оно составляет около 0,5% через 6 сут после введения вирусов. Данные биотитрования асцитической жидкости мышей С57В1 также показали очень низкий уровень репродукции ВОВ. В среднем титр частиц ВОВ не превышал $10^2 - 10^3$ БОЕ/мл асцитической жидкости.

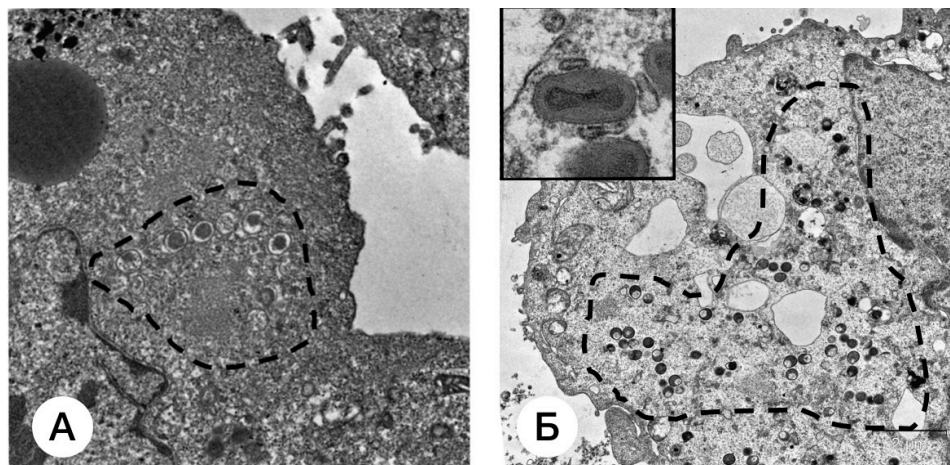


Рисунок 4. Ультратонкие срезы клеток асцитной карциномы Эрлиха через 3 сут после интраперитонеального введения штамма VVdGF-ApoS24/2 (А) и штамма Л-ИВП ВОВ (Б). Пунктирной линией обведены скопления ВОВ в цитоплазме клеток асцитной карциномы Эрлиха. На врезке – зрелый вирион штамма VVdGF-ApoS24/2 при большом увеличении.

Прямой подсчет выявил значительное снижение количества клеток асцитной карциномы Эрлиха в состоянии митоза после однократного введения штаммов ВОВ по сравнению с введением 0,9% раствора NaCl ($p < 0,05$). При этом количество клеток в состоянии митоза у мышей, получавших штамм VVdGF-ApoS24/2, значительно не отличалось от такового у мышей, получавших инъекции штамма Л-ИВП ВОВ (рис. 5).

Иммуногистохимическое выявление белков Ki-67 (маркер клеток, находящихся в активной фазе клеточного цикла) и PCNA (маркер S-фазы клеточного цикла) на парафиновых срезах осадков асцитической жидкости мышей С57В1 с привитой внутрибрюшинно карциномой Эрлиха показало, что однократные инъекции штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ приводили к значительному ($p < 0,05$) увеличению количества клеток, экспрессирующих белки Ki-67 и PCNA, по сравнению с введением 0,9% раствора NaCl (рис 6). Иными словами, было обнаружено увеличение числа клеток асцитной карциномы Эрлиха, клеточный цикл которых остановился в S-фазе после введения мышам штаммов ВОВ.

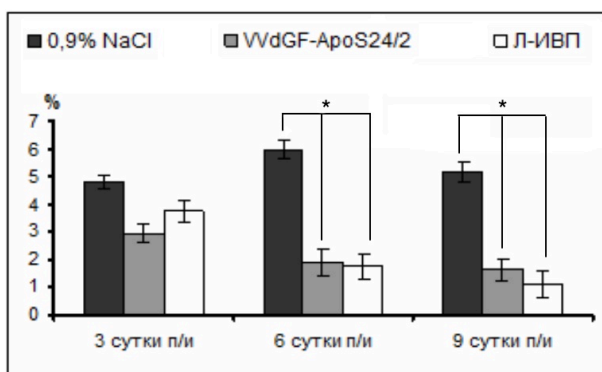


Рисунок 5. Количество клеток асцитной карциномы Эрлиха, привитой мышам С57В1, в состоянии митоза после интраперитонеального введения 0,9% раствора NaCl, штаммов Л-ИВП и VVdGF- ApoS24/2 ВОВ (* $p < 0,05$).

Количество клеток карциномы Эрлиха, экспрессирующих белки Ki-67 и PCNA на парафиновых срезах осадков асцитической жидкости после введения рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 значительно ($p < 0,05$), превышало таковое после введения штамма Л-ИВП ВОВ (рис. 6), что свидетельствует о способности апоптоина оказывать влияние на клеточный цикл асцитной карциномы Эрлиха. Таким образом,стройка трансгена, кодирующего апоптин, усиливает эффект «остановки» клеточного цикла в S-фазе под влиянием штамма VVdGF-ApoS24/2 по сравнению со штаммом Л-ИВП ВОВ.

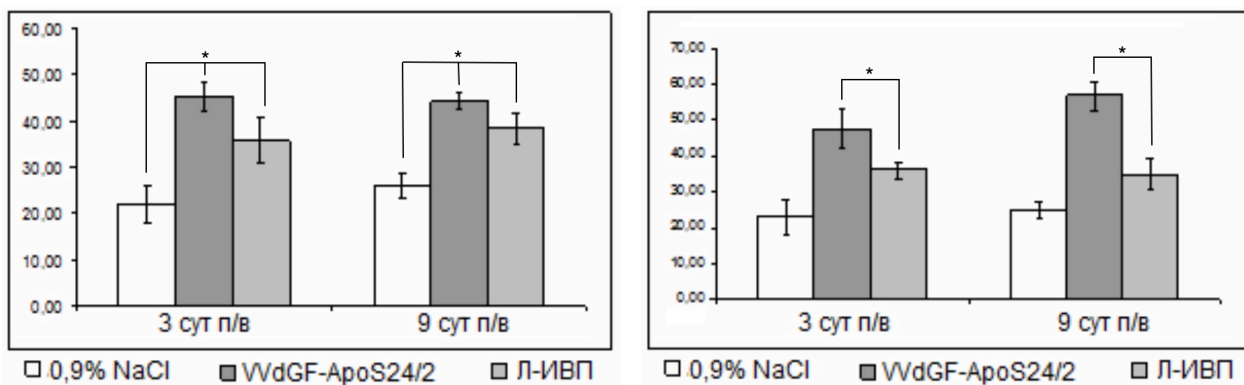


Рисунок 6. Изменение количества Ki-67- (А) и PCNA-положительных (Б) клеток асцитной карциномы Эрлиха, привитой мышам С57В1, после интраперитонеального введения 0,9% раствора NaCl, штамма Л-ИВП ВОВ и штамма VVdGF-ApoS24/2 ВОВ. Экспрессию белков выявляли иммуногистохимически на парафиновых срезах.

Заключение. Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 ВОВ обладает отчетливым онколитическим действием на ксенографты карциномы А431 человека и трансплантаты мышинной 171717 карциномы Эрлиха при однократном интратуморальном введении. Основным механизмом противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 на ксенографты карциномы А431 является прямое разрушение опухолевых клеток размножающимся вирусом с последующим «усыханием» опухоли.

Экспрессия апоптина в составе вирусного генома штамма VVdGF-ApoS24/2 не индуцирует апоптоз клеток человеческой и мышинной опухолей. В случае мышинной карциномы Эрлиха основным механизмом уменьшения размеров опухолевых узлов выступает «остановка» клеточного цикла опухолевых клеток в S-фазе, усиленная взаимодействиями апоптина.

ВЫВОДЫ

1. Рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 BOB активно реплицируется в клетках ксенографтов карциномы A431 человека у мышей nude, и очень слабо - в клетках асцитной карциномы Эрлиха мышей. Репликация штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB сопровождается формированием морфологически полноценных вирионов.

2. Онколитический эффект рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 при введении в ксенографты карциномы A431 и трансплантаты карциномы Эрлиха у мышей не уступает эффекту исходного штамма Л-ИВП BOB, несмотря на аттенуацию и сниженный уровень репликации рекомбинантного штамма.

3. Обнаружен ранее не описанный механизм противоопухолевого действия рекомбинантного штамма BOB – «остановка» клеточного цикла в S-фазе, приводящий к замедлению роста карциномы Эрлиха после введения штамма VVdGF-ApoS24/2. Основной составляющей онколитического действия штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB на ксенографты карциномы A431 человека у мышей nude является деструкция опухолевых клеток вследствие репродукции вируса.

4. Экспрессия апоптина выявляется в цитоплазме опухолевых клеток, инфицированных штаммом VVdGF-ApoS24/2 BOB. Встройка трансгена апоптина в геном штамма Л-ИВП BOB:

- не увеличивает частоту встречаемости апоптоза в клетках инфицированных ксенографтов карциномы A431 человека и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей;
- изменяет характер разрушения клеток карциномы A431, на месте которых в поздние сроки после введения вируса (35-55 сут) локализуются скопления филаментозных структур и небольшое количество клеточного детрита, отсутствует экссудат;
- значительно снижает митотическую активность клеток ксенографтов карциномы A431 и трансплантатов карциномы Эрлиха, а также усиливает остановку в S-фазе клеточного цикла клеток трансплантатов карциномы Эрлиха.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Galina Kochneva, Evgeniy Zonov, Antonina Grazhdantseva, Anastasiya Yunusova, Galina Sibolobova, Evgeniy Popov, Oleg Taranov, Sergei Netesov, Peter Chumakov, Elena Ryabchikova. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression //Oncotarget. – 2014. – Т.5. - № 22. – С. 11269-82.
2. Юнусова А.Ю., Зонов Е.В., Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И. Морфология ксенографтов карциномы А431 человека у мышей линии nude //Вестник НГУ. – 2014. – Т.12. – №3. – С. 42-48.
3. Evgeniy Zonov, Galina Kochneva, Anastasiya Yunusova, Antonina Grazhdantseva, Vladimir Richter, Elena Ryabchikova. Features of the Antitumor Effect of Vaccinia Virus Lister Strain //Viruses. - 2016. –Т.8. - №1.
4. Зонов Е.В., Кочнева Г.В., Тупицына А.В., Рябчикова Е.И. Противоопухолевый эффект апоптин-продуцирующего рекомбинантного штамма осповакцины *in vivo* связан с блокированием митотического деления опухолевых клеток // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. - №4. - С. 154-159.
5. Зонов Е.В., Юнусова А.Ю., Попов Е.В. Природные онколитические свойства вируса осповакцины //VI всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013», 19-23 августа, 2013, Иркутск, Россия, С.431-432
6. Зонов Е.В., Юнусова А.Ю., Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И. Механизмы онколитического действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего вируса осповакцины //I Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, 7-8 октября, 2014, Научоград Кольцово, Россия, ISBN 978-5-4437-0297-1. С.21-23.
7. Е.В. Зонов, Г. В. Кочнева. Противоопухолевое действие рекомбинантного апоптин-продуцирующего вируса осповакцины на карциному Эрлиха мышей // VII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых- биологов “Симбиоз-Россия 2015”, 5-9 октября, 2015, Новосибирск, Россия, С. 100-102.