

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Юнусова Анастасия Юрьевна

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы (диссертации)**

**ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ШТАММОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ
ОНКОТОКСИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ЛАКТАПТИН, NS1, АПОПТИН**

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.03.04 Клеточная биология, цитология,
гистология

Новосибирск – 2018

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Разработка новых противоопухолевых препаратов и способов лечения рака актуальна, поскольку применяемые схемы лечения рака не гарантируют полного выздоровления пациента. Перспективным направлением разработок является лечение опухолей с помощью *онколитических вирусов* – вирусов, которые избирательно инфицируют и разрушают опухолевые клетки. В настоящий момент одобрены для применения в клинике рекомбинантный аденовирус (препарат онкорин/ONYX-015, 2005 г, Китай) и рекомбинантный вирус простого герпеса (2015 – 2016 г, США, Канада, Европа и Австралия (Fukuhara et al., 2016)). Ряд онколитических вирусов проходит клинические испытания. В числе перспективных вирусов с онколитическими свойствами выделяется вирус осповакцины (ВОВ), который в ходе многолетнего применения в качестве вакцины против натуральной оспы зарекомендовал себя как безопасный для человека. Онколитическими свойствами обладают и рекомбинантные штаммы ВОВ (Eder et al., 2000; Schnierle et al., 2007).

Создание рекомбинантных онколитических вирусов – одно из основных направлений разработок противоопухолевых средств на основе вирусов. Полагают, что встройка в геном вирусов генов онкотоксических белков должна усиливать их онколитические свойства (Wu et al. 2011). Онкотоксические белки апоптин, NS1 и лактаптин способны вызывать апоптоз опухолевых клеток (Koval et al. 2012, Bullenkamp et al. 2014, Marchini et al. 2015). В литературе описано несколько рекомбинантных вирусов, продуцирующих апоптин, включая рекомбинантный ВОВ (штамм VVdGF-ApoS24/2), данные о штаммах онколитических вирусов, продуцирующих белки лактаптин и NS1 не опубликованы.

В ФБУН ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора были сконструированы штаммы ВОВ со встройкой генов одного из белков: NS1, апоптина или лактаптина, которые рассматриваются как потенциальные терапевтические агенты против глиом, эпителиоидной карциномы и рака молочной железы человека, соответственно.

Цель исследования: изучить механизмы противоопухолевого действия рекомбинантных штаммов ВОВ, продуцирующих онкотоксические белки апоптин, NS1 и лактаптин.

Задачи исследования:

1) Сравнить морфологические параметры противоопухолевого эффекта рекомбинантных штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1-DelIII ВОВ, продуцирующих белок парвовируса грызунов NS1, на модели ксенографтов глиомы человека U87MG, привитых мышам nude;

2) Изучить механизмы противоопухолевого действия рекомбинантного штамма VV-GMCSF/lact-dGF ВОВ, продуцирующего химерный белок ГМ-КСФ/лактаптин, на модели ксенографтов карциномы человека BT549, привитых мышам nude;

3) Изучить морфологические параметры противоопухолевого и антиметастатического действие рекомбинантного штамма VV(Apo)-GFP2 ВОВ, продуцирующего белки апоптин и GFP2, на модели искусственного метастаза карциномы A431.

Научная новизна работы. В работе впервые описаны морфологические характеристики противоопухолевого эффекта рекомбинантных штаммов ВОВ, продуцирующих белок NS1 парвовируса грызунов (MVA-NS1-DelIII и VV-NS1-dGF) и штамма, продуцирующего химерный белок ГМ-КСФ/лактаптин (VV-GMCSF/lact-dGF).

Впервые показано, что встройка гена лактаптина в комбинации с геном ГМ-КСФ в геном ВОВ значительно усиливает противоопухолевый эффект вируса, который определяется тремя факторами: (1) прямой лизис клеток, (2) индукция апоптоза клеток и (3) привлечение клеток иммунной системы в опухоль.

В работе впервые показано антиметастатическое действие рекомбинантного штамма ВОВ, продуцирующего белок апоптин, а также его способность вызывать апоптоз опухолевых клеток ксенографтов карциномы человека A431.

Установлена зависимость способности рекомбинантных штаммов ВОВ индуцировать апоптоз опухолевых клеток от уровня репродукции вируса.

Впервые показано, что встройка генов онкотоксических белков в геном ВОВ не влияет на морфогенез вируса.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты выполненной работы важны для методологии разработки и тестирования рекомбинантных онколитических вирусов. В работе описана удобная для оценки адресности распространения и антиметастатического потенциала противоопухолевых средств модель искусственного метастаза (прививка двух ксенографтов карциномы А431), предложенная д.б.н. Кочневой Г.В.

Представленная морфологическая характеристика опухолевых клеток линий U87MG, MDA-MB 231, BT549, A431 и соответствующих ксенографтов, а также изменения их структуры при инфицировании ВОВ могут быть использованы в исследованиях эффектов противоопухолевых средств и в учебной литературе. Полученные в данной работе результаты, показывающие противоопухолевую эффективность исследованных штаммов, могут способствовать внедрению рекомбинантных штаммов ВОВ в клиническую практику для лечения онкологических заболеваний.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач был использован комплекс современных методов исследований, позволивший получить полное представление о процессе деструкции ксенографтов разных опухолей человека при репродукции штаммов ВОВ, продуцирующих белки NS1, лактаптин и апоптин. Исследование выполнено на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Основные методы исследования: световая и просвечивающая электронная микроскопия, иммуногистохимическое выявление маркеров клеточных процессов на парафиновых срезах, морфометрический анализ.

Положения, выносимые на защиту:

1) Встройка генов онкотоксических белков апоптина, NS1 и лактаптина в геном ВОВ не оказывает заметного влияния на морфологию вирусных частиц и морфологические параметры репродукции вируса.

2) Рекомбинантные штаммы VV-NS1-dGF, VV-GMCSF/lact-dGF и VVdGF(Apo)-GFP2, сконструированные на основе штамма Л-ИВП и продуцирующие белки NS1, ГМ-КСФ/лактапин и апоптин, соответственно, оказывают выраженный противоопухолевый эффект после однократного интратуморального введения мышам с привитыми ксенографтами опухолей человека.

3) Однократной интратуморальной инъекции штамма MVA-NS1-DelII недостаточно для полного разрушения ксенографтов глиомы человека U87MG у мышей nude, однако, этот штамм более эффективно вызывает апоптоз опухолевых клеток, по сравнению со штаммом VV-NS1-dGF, главным параметром противоопухолевого действия, которого является прямой лизис клеток.

4) Противоопухолевое действие штамма VV-GMCSF/lact-dGF ВОВ, продуцирующего химерный белок ГМ-КСФ/лактапин, складывается из трёх факторов: (1) прямой лизис опухолевых клеток, (2) индукция апоптоза опухолевых клеток и (3) привлечение эффекторных клеток иммунной системы в разрушающуюся ткань ксенографтов.

5) Рекомбинантный штамм VVdGF(Apo)-GFP2 обладает выраженным противоопухолевым и антиметастатическим действием в отношении ксенографтов карциномы человека A431, привитых мышам nude, его противоопухолевая активность определяется главным образом (1) прямым лизисом опухолевых клеток, а также (2) индукцией апоптоза опухолевых клеток.

6) Способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток более выражена у рекомбинантных штаммов ВОВ, характеризующихся низким уровнем репродукции, штаммы с высоким уровнем репродукции обладают более выраженным противоопухолевым действием.

Степень достоверности и апробация работы. Высокая степень достоверности результатов работы обеспечивается достаточным объёмом экспериментального материала, его анализом на высоком экспериментально-методическом уровне с использованием высокотехнологичного оборудования.

Материалы диссертации были представлены на II международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio (Новосибирск, Кольцово, 2015), на VII Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз» (Новосибирск, 2015), на VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015) и на конференции «Биотехнология – медицина будущего» (Новосибирск, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них 5 – статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Личное участие автора. Светооптическое и ультраструктурное исследование образцов, иммуногистохимическое выявление антигенов на парафиновых срезах и морфометрия выполнены автором лично. Автор работы принимала непосредственное участие в планировании экспериментов, обсуждении полученных результатов и написании статей.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», содержит «Выводы» и «Список литературы», включающий 194 публикаций. Работа изложена на 151 странице, содержит 1 таблицу, 33 иллюстрации из них 12 – схемы и 21 – рисунки.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность д.б.н. Кочневой Г. В. и к.м.н. Гражданцевой А. А. за проведение экспериментов с культурами клеток, животными и вирусами (лаборатория вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки опухолей человека линий A431 (эпидермоидная карцинома), U87MG (глиома), BT549 и MDA-MB 231 (рак молочной железы) получены из коллекции ATCC (Манассас, Вирджиния, США). **Штаммы ВОВ** (VV-NS1-dGF, VVdGF(Apo)-GFP2, VV-GMCSF-dGF, VV-GMCSF/lact-dGF и MVA-NS1-DelII) созданы в лаборатории вирусных гепатитов (зав. лаб. д.б.н. Кочнева Г.В.) ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Онколитическую активность штаммов определяли по стандартной методике с использованием реагента ХТТ (Scudiero et al. 1988) **in vitro** и выражали как ЦТД₅₀ – концентрацию вируса, вызывающую гибель 50% клеток.

Эксперименты in vivo. Для формирования ксенографтов мышам линии nude (получены из Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова НПП «Питомника лабораторных животных» (Московская область, г. Пущино) подкожно в область левого бедра вводили суспензии опухолевых клеток. Для моделирования метастаза мышам прививали пару ксенографтов карциномы А431 (в области левого и правого бедра). Клетки линий А431 и ВТ549 вводили в количестве 5×10^6 , клетки U87MG – 3×10^6 клеток/мышь в 100 мкл стерильного раствора NaCl (0,9%). Клетки U87MG вводили в смеси 2:1 с Matrigel (BD Bioscience, США). Противоопухолевое действие рекомбинантных штаммов оценивали после их однократного интратуморального введения (10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл раствора). Мышам с ксенографтами глиомы U87MG вводили штаммы VV-NS1-dGF или MVA-NS1-DeIII. Мышам с ксенографтами карциномы ВТ549 – штаммы VV-GMCSF/lact-dGF или VV-GMCSF-dGF. Мышам с парами ксенографтов карциномы А431 вводили штамм VVdGF(Apo)-GFP2 в один из ксенографтов («опухоль»), второй ксенографт оставляли интактным («метастаз»). Мышам контрольной группы интратуморально вводили 100 мкл раствора NaCl (0,9%). Образцы ксенографтов для гистологического исследования отбирали каждые 2 – 3 сут после введения вирусов.

Все исследования на культурах клеток и животных проведены в лаборатории вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), для морфологических исследований в ИХБФМ СО РАН передан фиксированный материал.

Светооптические и иммуногистохимические исследования. Фиксированные в растворе параформальдегида (4%) фрагменты ксенографтов обезвоживали стандартным методом с использованием гистологического автомата Sakura Tissue-Tek II (Sakura, Япония) и заключали в парафиновые блоки.

С блоков готовили срезы толщиной 3–4 мкм на микротоме Leica RM 2255 (Лейка, Германия), которые монтировали на предметные стекла. Для светооптического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином или по пикро Малори и заключали в среду для заливки BioMount (Бiovитрум, Россия). Для проведения иммуногистохимических реакций срезы монтировали на стекла, покрытые полилизинном (Thermo Scientific, США). Реакции с антителами к белкам ki-67, каспаза-3, LC3II-B, CD11b (Abcam, Великобритания) и FLAG-последовательности белков апоптин и NS1 (Санта-Круз, США) проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Окрашенные срезы изучали с помощью светового микроскопа исследовательского класса Leica DM 2500 (Лейка, Германия). Фотосъемку проводили с помощью цифровой камеры Leica DFC420 C (Лейка, Германия). Число клеток с положительной реакцией с антителами подсчитывали на снимках участков парафиновых срезов при увеличении объектива x40 (или x20). При подсчёте учитывали не менее 2000 клеток для каждой пробы.

Электронно-микроскопическое исследование. Фрагменты (2 – 4 мм) ксенографтов, фиксированные параформальдегидом (4%), постфиксировали в 1%-ом растворе четырехокси осмия (SPI, США), обезвоживали и заливали в смесь эпон-аралдит (SPI, США) по стандартной методике (Уикли, 1975). С блоков готовили на ультратоме Leica EM UC7 ультратонкие срезы, которые контрастировали растворами цитрата свинца и уранилацетата (SPI, США) и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Джеол, Япония). Фотосъемку производили с помощью цифровой камеры бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

Морфометрия и статистический анализ осуществляли с помощью программ Axio Vision SE64 Rel. 4.9.1., ImageJ и STATISTICA 8. Достоверность различий оценивали методом Манна-Уитни-Уилкоксона (U-критерий Манна-Уитни, $P < 0,05$). Данные на графиках представлены как среднее и ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование рекомбинантных онколитических вирусов, обладающих «специальными» свойствами – одно из основных направлений разработок противоопухолевых средств на основе вирусов. Создание «новых» вирусов требует детального изучения механизмов их онколитического действия. Зачастую эффект онколитических вирусов оценивается лишь на основании измерения опухолей. Однако, действие вирусов реализуется, прежде всего, на уровне клеток, стало быть, для понимания механизмов их противоопухолевого действия, необходимо его изучать на клеточном и тканевом уровне. Гистологическое исследование является самым надёжным методом оценки «ответа опухоли на лечение», позволяющим установить разрушение её элементов и возможность рецидива (Rubbia-Brandt et al. 2007, Грабовой и др. 2012). Прямая визуализация вирусных частиц с помощью электронного микроскопа, наряду с методом биотитрования, позволяет оценить уровень репродукции вируса в опухолевых клетках, а также определить тип зараженных клеток в опухоли, что необходимо для оценки селективности вируса. Сочетание традиционных методов вирусологии и микроскопии на разных уровнях (световая и электронная микроскопия) позволяет всесторонне оценить параметры противоопухолевого эффекта вирусов.

В данной работе было исследовано онколитическое действие *in vitro* и *in vivo* пяти рекомбинантных штаммов ВОВ: 1, 2) штаммы **VV-NS1-dGF** и **MVA-NS1-DelIII** имеют встройку гена белка NS1, штамм VV-NS1-dGF сконструирован на основе штамма Л-ИВП, а штамм MVA-NS1-DelIII – на основе высоко аттенуированного штамма MVA; 3, 4, 5) штаммы **VVdGF(Apo)-GFP2**, **VV-GMCSF-dGF**, **VV-GMCSF/lact-dGF** сконструированы на основе штамма Л-ИВП, штамм VVdGF(Apo)-GFP2 имеет встройки генов белков GFP и апоптина, штамм VV-GMCSF-dGF имеет встройку гена ГМ-КСФ, штамм VV-GMCSF/lact-dGF имеет встройку гена химерного белка ГМ-КСФ/лактаптин.

Морфологические параметры репродукции и противоопухолевое действие рекомбинантных штаммов ВОВ оценивали на опухолевых клетках различных линий, в зависимости от встроенных генов. Так, действие штамма VV-

GMCSF/lact-dGF, со встройкой гена лактапина, оценивали в отношении клеток рака молочной железы, поскольку белок лактапин, прежде всего, рассматривается как потенциальное лекарственное средство против рака молочной железы (Koval et al. 2014). Действие штаммов, имеющих встройки гена белка NS1 – VV-NS1-dGF и MVA-NS1-DelIII оценивали на клетках глиомы человека линии U87MG, так как из литературных данных известно, что парвовирус, из которого выделен белок NS1, и сам этот белок эффективно разрушают клетки глиом (Marchini et al. 2015). Противоопухолевое действие штамма VVdGF(Apo)-GFP2 исследовали на модели ксенографтов карциномы человека A431, так как экспериментально было установлено, что эти клетки высоко чувствительны к разрушающему (цитотоксическому) действию штамма Л-ИВП ВОВ, а также штамма, продуцирующего апоптин (Kochneva et al. 2013; Zonov et al. 2016).

Проведённое исследование показало, что рекомбинантные штаммы ВОВ, сконструированные на основе штамма Л-ИВП, имеют одинаковые морфологические признаки репродукции (рис. 1), которые не отличаются от таковых у штамма Л-ИВП, следовательно, генетические модификации вируса

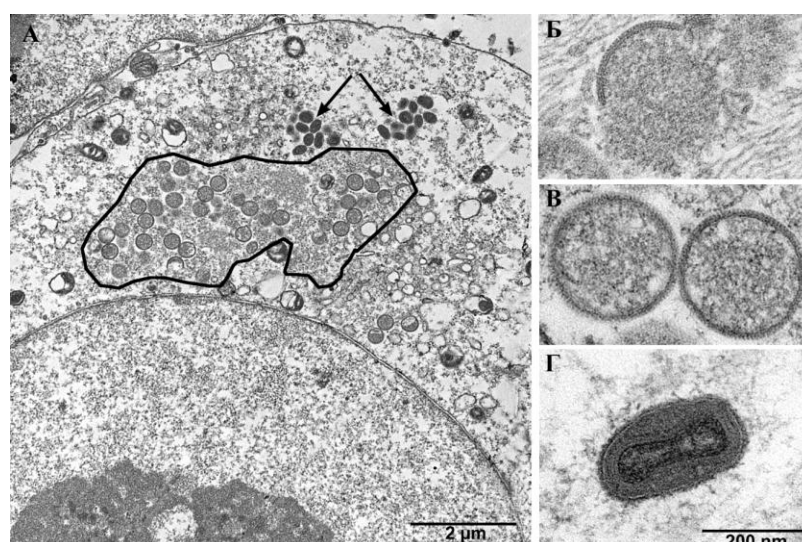


Рисунок 1. Репродукция ВОВ. А – вирусная фабрика штамма Л-ИВП (обведена контуром), скопления зрелых вирионов (→); Б – формирующаяся мембрана незрелого вириона ВОВ, на поверхности видны шипики (спикулы); В – незрелые вирионы ВОВ; Г – зрелый вирион ВОВ. Ультратонкие срезы.

(делеции и/или встройки генов) заметно не влияют на его морфогенез. В то же время встройка гена того или иного онкотоксического белка в геном ВОВ обычно усиливает цитотоксическую активность рекомбинантного вируса в отношении опухолевых клеток по сравнению с исходным штаммом. Например, встройка гена химерного белка ГМ-КСФ/лактапин в геном ВОВ усиливает цитотоксическую активность вируса в отношении опухолевых клеток различных линий, в том числе и клеток рака молочной железы линии BT549.

Встройка гена NS1 достоверно усиливает цитотоксическую активность ВОВ в отношении клеток глиомы ($P < 0,05$). В качестве группы сравнения для оценки активности рекомбинантного штамма VV-NS1-dGF использовали штамм VVdGF2/6 с делецией гена VGF, но без встройки гена белка NS1 (Kochneva et al. 2013). ЦТД₅₀ штаммов VV-NS1-dGF и VVdGF2/6 составляет $0,082 \pm 0,01$ и $0,3 \pm 0,01$ БОЕ/клетку, соответственно. Аналогичный эффект встройки трансгена отмечен для рекомбинантного штамма MVA-NS1-DelIII. В данном случае в качестве контроля был использован родительский штамм MVA. ЦТД₅₀ штаммов MVA-NS1-DelIII и MVA составляет $0,096 \pm 0,01$ и $0,2 \pm 0,01$ БОЕ/клетку, соответственно.

Репродукция всех исследованных в работе штаммов приводила к деструкции опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Деструктивное действие штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1-DelIII *in vitro* с апоптозом не связано. Инфицированные этими штаммами клетки U87MG приобретают морфологические признаки некроза – отёк цитоплазмы, цистерн гранулярного ЭПР, нарушение целостности плазматической мембраны. Способность штамма VV-GMCSF/lact-dGF вызывать апоптоз опухолевых клеток *in vitro* реализовалась по-разному в клетках разных линий. Так, число каспаза-3-позитивных клеток линии BT549 не различается при инфекции штаммами VV-GMCSF/lact-dGF и VV-GMCSF-dGF. В тоже время число позитивно окрашенных клеток линии MDA-MB 231 при инфицировании штаммом VV-GMCSF/lact-dGF достоверно больше, чем при инфицировании штаммом VV-GMCSF-dGF. Электронно-микроскопическое исследование показало, что погибшие клетки линии BT549 не имеют морфологических признаков апоптоза, в отличие от клеток линии MDA-MB 231,

инфицированных штаммом VV-GMCSF/lact-dGF. В первом случае в клетках отмечается повреждение плазмалеммы и нарушение архитектоники цитоплазмы (признаки некроза), во-втором часто регистрируются фрагментированные ядра с конденсированным хроматином (признак апоптоза), в ядрах выявляются электронно-плотные скопления, напоминающие полулуния. Интересно, что рекомбинантный штамм VV-GMCSF/lact-dGF более активно размножается в клетках рака молочной железы линии BT549 по сравнению с линией MDA-MB 231, тогда как апоптоз с большей вероятностью индуцирует в клетках рака молочной железы линии MDA-MB 231.

Анализ полученных результатов показал, что деструктивное действие исследованных рекомбинантных штаммов *in vivo* складывается из трёх факторов: (1) прямой лизис опухолевых клеток, (2) индукция апоптоза опухолевых клеток и (3) привлечение эффекторных клеток иммунной системы в разрушающуюся ткань ксенографтов, которые у разных штаммов выражены в разной степени. Главным фактором противоопухолевого действия исследованных рекомбинантных штаммов BOB является прямой лизис клеток при репродукции BOB.

Штамм VV-NS1-dGF полностью разрушает ксенографты глиомы U87MG через 15 сут после однократного введения. В то же время штамм MVA-NS1-DelIII, имеющий аналогичную встройку гена белка NS1, но сконструированный на основе высоко аттенуированного штамма MVA, разрушает не более 50% ткани ксенографтов. Случаев полной деструкции ксенографтов глиомы после инъекции штамма MVA-NS1-DelIII не обнаружено вплоть до окончания эксперимента (23 сут после введения вируса), не возростала и доля разрушенной ткани (рис. 2). Таким образом, штамм VV-NS1-dGF, сконструированный на основе штамма Л-ИВП, более эффективно разрушает ксенографты глиомы U87MG, по сравнению с высоко аттенуированным штаммом MVA-NS1-DelIII. Введение этих штаммов не привлекает эффекторные клетки иммунной системы (моноциты и гранулоциты) в ткань ксенографтов глиомы U87MG.

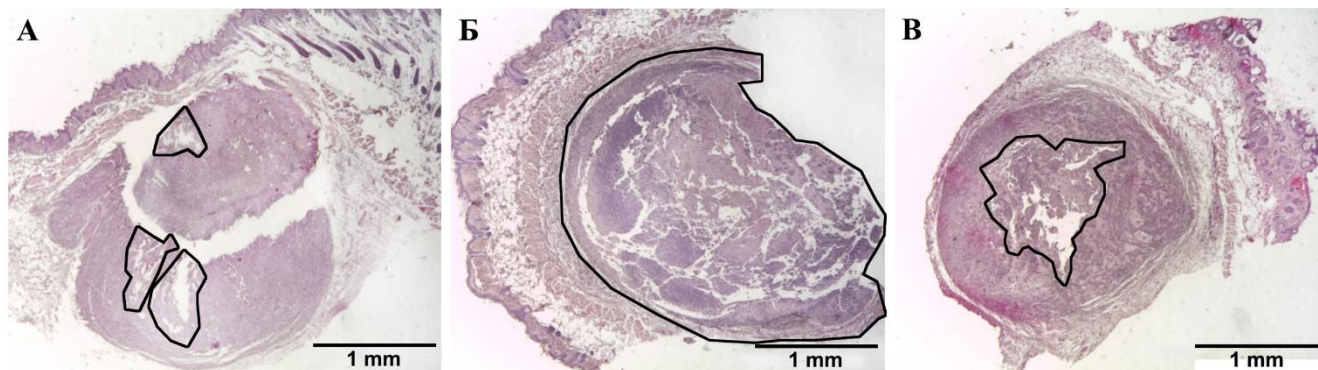


Рисунок 2. Срезы ксенографтов глиомы U87MG через 23 сут после инъекции (А) раствора NaCl (0.9%), штаммов (Б) VV-NS1-dGF или (В) MVA-NS1-DelIII; контуром обведены зоны некроза. Окр. гематоксилином и эозином.

Репродукция штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1-DelIII приводит к разрушению опухолевых клеток ксенографтов глиомы U87MG. Основной механизм гибели инфицированных клеток – некроз (лизис клеток), однако, отмечаются и случаи апоптоза. Иммуногистохимически установлено, что введение обоих штаммов приводит к увеличению числа каспаза-3-позитивных клеток в ксенографтах. Через 5 сут после введения число каспаза-3-позитивных клеток достоверно не различается в ксенографтах после введения штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1-DelIII. Через 15 сут после введения штамма MVA-NS1-DelIII число каспаза-3-позитивных клеток существенно увеличивается до 27% (по сравнению с таковым числом через 5 сут – 14%), тогда как после введения штамма VV-NS1-dGF все клетки в ксенографтах разрушены и каспаза-3-позитивные клетки не выявляются.

Таким образом, штаммы VV-NS1-dGF и MVA-NS1-DelIII разрушают ксенографты глиомы U87MG главным образом за счёт прямого лизиса опухолевых клеток, поскольку штамм MVA-NS1-DelIII, несмотря на способность вызывать апоптоз опухолевых клеток, не способен полностью разрушить ксенографты.

Штамм VV-GMCSF/lact-dGF практически полностью разрушает ксенографты карциномы BT549 через 10 сут после введения. Ксенографты, иссеченные в это время, представляют собой скопление клеточного детрита, в котором выявляются единичные опухолевые клетки, сохранившие свою

целостность. В узлах же, иссеченных через 10 сут после инъекции штамма VV-GMCSF-dGF, который продуцирует только белок ГМ-КСФ, сохраняется 30 – 40% ткани опухоли, морфологически идентичной ткани ксенографтов мышей контрольной группы. Таким образом, штамм VV-GMCSF/lact-dGF, продуцирующий химерный белок ГМ-КСФ/лактапин, эффективнее разрушает ксенографты карциномы BT549 у мышей nude по сравнению со штаммом VV-GMCSF-dGF, продуцирующим только белок ГМ-КСФ.

Полученные результаты показывают, что репродукция штамма, продуцирующего химерный белок ГМ-КСФ/лактаптин, в клетках ксенографтов карциномы BT549 не только вызывает лизис клеток, но и способствует гибели опухолевых клеток путем апоптоза (рис. 3А). Каспаза-3-позитивные клетки локализуются в участках ксенографтов, соответствующих зоне репродукции вируса, их число вдвое больше в опухолях после инъекции штамма VV-GMCSF/lact-dGF, чем после введения штамма VV-GMCSF-dGF (рис. 3Б). По-видимому, проапоптотическое действие штамма VV-GMCSF/lact-dGF реализуется за счёт лактапина, продуцируемого вирусом в составе химерного белка. Кроме того, введение штамма VV-GMCSF/lact-dGF приводит к накоплению CD11b-

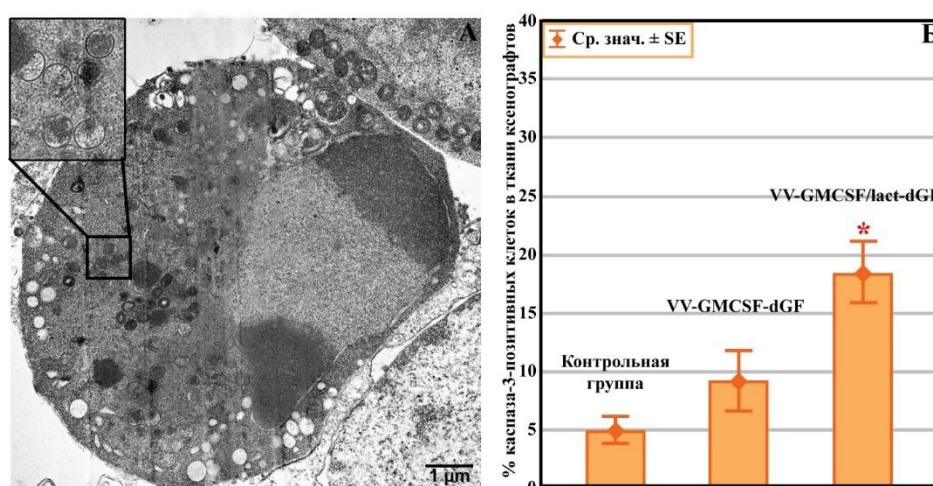


Рисунок 3. А – Апоптоз инфицированной штаммом VV-GMCSF/lact-dGF опухолевой клетки ксенографта карциномы BT549, на врезке – вирионы ВОВ, ультратонкий срез; Б – Число каспаза-3-позитивных клеток в ксенографтах через 6 сут после введения 0,9% NaCl (контрольная группа) и штаммов VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF/lact-dGF ВОВ, достоверное отличие (*), $P > 0.05$;

позитивных клеток (моноциты и гранулоциты) в соединительной ткани, прилегающей к ксенографтам и вокруг кровеносных сосудов ксенографтов. Это явление отсутствует при репродукции штамма VV-GMCSF-dGF и, очевидно, связано с действием химерного белка ГМ-КСФ/лактаптин.

Таким образом, встройка гена химерного белка ГМ-КСФ/лактапин в геном ВОВ усиливает противоопухолевый эффект вируса. Деструктивное действие полученного штамма (VV-GMCSF/lact-dGF) складывается из трёх факторов: (1) прямой лизис опухолевых клеток, (2) индукция апоптоза опухолевых клеток и (3) привлечение эффекторных клеток иммунной системы в разрушающуюся ткань ксенографтов.

Потенциально терапевтические онколитические вирусы должны разрушать не только первичные опухолевые узлы, но и удалённые метастазы. В связи с этим в настоящей работе было исследовано противоопухолевое и антиметастатическое действие штамма VVdGF(Apo)-GFP2 ВОВ, продуцирующего белки GFP и апоптин, на модели искусственного метастаза карциномы A431 у мышей nude. Продукция этим штаммом флуоресцентного белка GFP позволяет визуализировать вирус в организме животного *in vivo* и оценить его способность проникать во внутренние органы и отдалённый метастаз.

Экспериментальной моделью опухоли и метастаза *in vivo* послужили пары удалённых друг от друга ксенографтов карциномы человека A431, привитые подкожно мышам линии nude. При таком способе трансплантации карцинома A431 развивается только в месте прививки и при введении вируса в один ксенографт («опухоль»), второй можно рассматривать как «метастаз» и использовать для оценки адресности распространения и онколитической активности вируса.

Проведённое гистологическое исследование показало, что однократное интратуморальное введение штамма VVdGF(Apo)-GFP2 в один ксенографт («опухоль») приводит к полной деструкции как опухоли (через 12 сут), так и «метастаза» (через 20 сут) (рис. 4 А). Деструкция опухолевых клеток в «метастазах» происходит с некоторым временным сдвигом, что, очевидно, обусловлено более поздним попаданием вируса в опухоль и меньшим его количеством. В «метастаз» вирус, очевидно, попадает с кровью, где он выявляется методом биотитрования в небольшом количестве (10^2 БОЕ/мл) через 24 ч после введения. Также с кровью вирус попадает во внутренние органы, где он

выявляется ($\leq 10^5$ БОЕ/мл) через 2 – 12 сут после введения. Через 14 сут после введения вирус выявляется только в ксенографтах А431, включая «метастаз», и сохраняется там до 35 сут (период наблюдения) в высокой концентрации (10^8 БОЕ/мл). Вторичного присутствия вируса в кровотоке (вирусемии) не отмечено в течение всего периода исследования (35 сут), что указывает на строгую внутриопухолевую локализацию рекомбинантного штамма VVdGF(Apo)-GFP2, а также на быстрое выведение вируса из органов.

Ультраструктурное исследование установило, что репродукция штамма VVdGF(Apo)-GFP2 в клетках ксенографтов карциномы А431 вызывает гибель клеток за счёт (1) прямого лизиса клеток, а также вызывает (2) апоптоз опухолевых клеток. Иммуногистохимическое выявление каспаза-3-позитивных клеток (рис. 4 Б) обнаруживает их большое количество в области разрушающейся

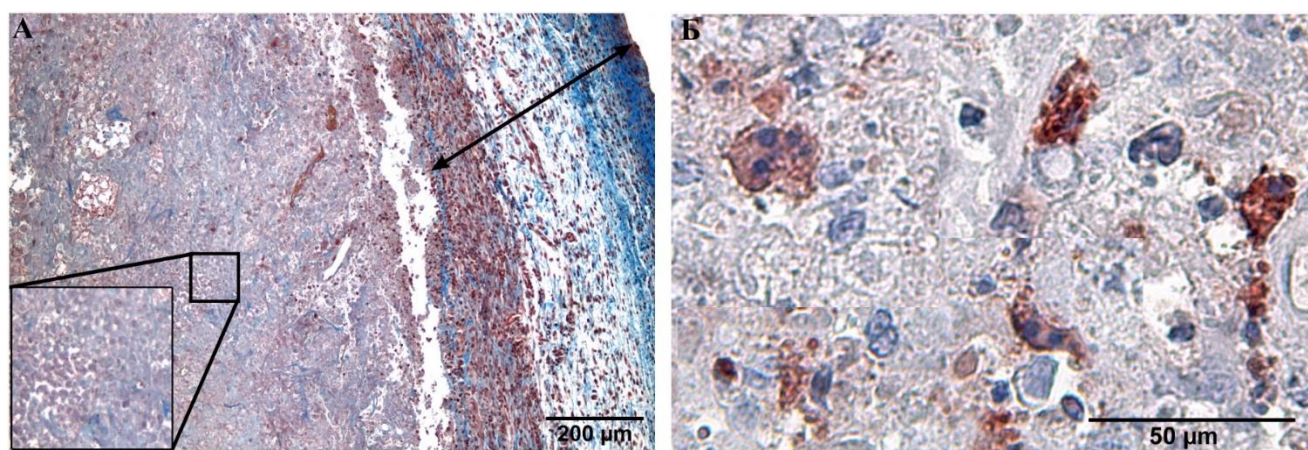


Рисунок 4. А – фрагмент «метастаза» карциномы А431 через 20 сут после введения штамма VVdGF(Apo)-GFP2 в опухоль, заполнен детритом, окружён капсулой (→), окраска по пикро Маллори; Б – апоптоз (каспаза-3-позитивные апоптотические тельца окрашены в красный цвет) в разрушенной ткани опухоли через 6 сут после введения штамма VVdGF(Apo)-GFP2, хромоген АЕС.

ткани опухолей – $(250 \pm 86) \times 10^3$ клеток на 1 мм^2 среза через 6 сут после введения вируса.

Противоопухолевое действие штамма VVdGF-Apo24S/2, который имеет аналогичную вставку гена апоптоина, но в отличие от штамма VVdGF(Apo)-GFP2 сохраняет ген тимидинкиназы, было изучено ранее (Kochneva et al., 2004).

Однократное интратуморальное введение штамма VVdGF-Apo24S/2 приводило к полной деструкции ксенографтов карциномы A431 через 8 сут, основным фактором его деструктивного действия является прямой лизис клеток. В ксенографтах после введения этого штамма число каспаза-3-позитивных клеток не превышало $72 \pm 3,8$ клеток на 1 мм^2 , что существенно меньше, чем после введения штамма VVdGF(Apo)-GFP2 (250 ± 86) $\times 10^3$ клеток на 1 мм^2).

Таким образом, штамм VVdGF(Apo)-GFP2 разрушает опухолевую ткань медленнее, чем штаммы Л-ИВП и VVdGF-Apo24S/2 (Kochneva et al. 2014), однако, он с большей вероятностью индуцирует апоптоз опухолевых клеток, что очевидно, связано с большей его аттенуацией. Интересно, что в данном случае, как и в случае штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1-DelIII способность индуцировать апоптоз в большей степени выражена у штамма с более низким уровнем репродукции и, соответственно, прямого деструктивного действия.

Заключение

Результаты проведенного исследования показывают, что штаммы VV-NS1-dGF, VV-GMCSF/lact-dGF и VVdGF(Apo)-GFP2, сконструированные на основе штамма Л-ИВП, обладают выраженным онколитическим действием и способны полностью разрушить ксенографты опухолей человека после однократного интратуморального введения. Основным механизмом противоопухолевого действия всех исследованных штаммов (включая MVA-NS1-DelIII) является прямой лизис опухолевых клеток, обусловленный репродукцией ВОВ. Способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток в большей степени выражена у рекомбинантных штаммов с низким уровнем репродукции и не определяет уровень деструктивного эффекта вирусов.

ВЫВОДЫ

1) Генетические модификации штаммов ВОВ (Л-ИВП или MVA) не влияют на морфологию вирусных частиц и морфологические параметры их репродукции. Морфологические параметры репродукции рекомбинантных штаммов ВОВ определяются параметрами штаммов ВОВ, на основе которых они были сконструированы (исходных штаммов).

2) Штамм VV-NS1-dGF, сконструированный на основе репликативно-компетентного штамма Л-ИВП, более эффективно разрушает ксенографты глиомы человека U87MG по сравнению со штаммом MVA-NS1-DelII, сконструированным на основе высоко аттенуированного штамма MVA. Штамм MVA-NS1-DelII более эффективно индуцирует апоптоз опухолевых клеток глиомы U87MG, чем штамм VV-NS1-dGF.

3) Штамм VV-GMCSF/lact-dGF, продуцирующий химерный белок ГМ-КСФ/лактапин, более эффективно разрушает ксенографты карциномы BT549 по сравнению со штаммом VV-GMCSF-dGF, продуцирующим только ГМ-КСФ. В отличие от последнего штамм VV-GMCSF/lact-dGF индуцирует апоптоз опухолевых клеток и привлекает эффекторные клетки иммунной системы в разрушающийся ксенографт, что очевидно усиливает противоопухолевый эффект штамма.

4) VVdGF(Apo)-GFP2 эффективно разрушает как ксенографт, в который его вводят, так и отдалённый «метастаз», проявляя таким образом не только противоопухолевое действие, но и антиметастатическое. Данный штамм индуцирует апоптоз опухолевых клеток ксенографтов карциномы A431.

5) Анализ противоопухолевого действия штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1-DelII, а также VVdGF(Apo)-GFP2 и VVdGF-Apo24S/2 показал, что апоптоз опухолевых клеток сопровождается инфекцией штаммами с низким уровнем репродукции, напротив, активно размножающиеся штаммы более эффективно/быстро разрушают опухоли за счёт прямого лизиса опухолевых клеток.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из списка ВАК:

- 1) **Юнусова А.Ю.**, Зонов Е.В., Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И. Морфология ксенографтов карциномы A431 человека у мышей линии nude // Вестник НГУ. – 2014 г. – вып. 3. – С. 42 – 49.

- 2) Kochneva G., Zonov E., Grazhdantseva A., **Yunusova A.**, Sibolobova G., Popov E., Taranov O., Netesov S., Chumakov P., Ryabchikova E. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression // *Oncotarget*. – 2014 г. – v. 5. – P. 12169 – 12182.
- 3) Кочнева, Г.В., Гражданцева, А.А., Сиволобова, Г.Ф., Ткачева, А.В., Швалов, А.Н., **Юнусова, А.Ю.**, Рябчикова, Е.И., Нетесов, С.В. Модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 на мышцах линии nude для исследования онколитической активности вируса осповакцины // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2015. – Т. 19. - № 4. – С. 77-85. *Переведена на английский язык.*
- 4) Zonov E., Kochneva G., **Yunusova A.**, Grazhdantseva A., Richter V., Ryabchikova E. Features of the antitumor effect of Vaccinia virus Lister strain // *Viruses*. – 2016. – 8. – №20. – P. 1 – 16.
- 5) Кочнева Г.В., Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., **Юнусова А.Ю.**, Рябчикова Е. И., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Рихтер В.А. Противоопухолевый потенциал рекомбинантного штамма вируса осповакцины, продуцирующего секретиремый химерный белок, состоящий из ГМ-КСФ человека и онкотоксического белка лактапина // *Биофармацевтический журнал*. – 2017. – Т.9. – №1. – Стр. 11-21.

Тезисы:

- 1) **Юнусова А. Ю.** Онколитическое действие рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего ген апоптоина, на ксенографты карциномы A431 у мышей nude // *Международная научная студенческая конференция: Тез. докл., 11-18 апреля 2014 г. – Новосибирск, 2014. – С. 147.*
- 2) **Юнусова А. Ю.**, Кочнева Г. В. Противоопухолевый эффект рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего апоптин, на модели искусственного метастазирования карциномы A431 // *II международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio: Тез. докл., 3-4 октября 2015 г. – Научоград Кольцово (Новосибирск), 2015. – С. 76.*

- 3) Юнусова А. Ю. Онколитическое действие рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего апоптин, на модели искусственного метастазирования карциномы А431 // VII Всероссийский с международным участием конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз»: Тез. докл., 5-9 октября 2015 г. – Новосибирск, 2015. – С. 22.
- 4) Юнусова А. Ю., Ткачёва А. В., Кочнева Г. В, Рябчикова Е. И. Противоопухолевый эффект рекомбинантных штаммов вируса осповакцины MVA и Л-ИВП, несущих встройку гена онкотоксического белка NS1 // конференции «Биотехнология – медицина будущего»: Тез. докл., 24-26 июля 2017 г. – Новосибирск, 2017. – С. 115.

Список сокращений: ВОВ – вирус осповакцины, ТК – тимидинкиназа, VGF – virus growth factor, ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ЦТД – цитотоксическое действие.

Отчет о проверке текста
научно-квалификационной работы
на объем заимствования

Юнусова Анастасия Юрьевна

«Противоопухолевое действие рекомбинантных штаммов вируса осповакцины,
продуцирующих онкотоксические белки лактаптин, ns1, апоптин»

Оценка оригинальности: 92.66%

Заимствования: 7.34%

№ документа: 991387

Имя исходного файла: Научный доклад Юнусова (2).docx

Размер файла: 5.2 МБ

Размер текста: 30648

Слов в тексте: 4274

Число предложений: 100

Источники (доля в тексте – ссылка):

7.6%

<http://www.fesmu.ru/elib/search.aspx?author=%22%CA%EE%F7%ED%E5%E2%E0%20%C3.%C2.%22>

16.8% <http://www.dslib.net/citologia/mehanizmy-onkoliticheskogo-dejstvija-rekombinantnogo-a...>

10.6% <https://4science.ru/conference2015/theses/14.604.21.0057>

5.1% <http://konf.x-pdf.ru/19biologiya/190612-1-ii-mezhdunarodnaya-konferenciya-molodih-uch...>

11.7% <http://www.dslib.net/citologia/jeksperimentalnoe-modelirovanie-processov-indukcii-dif...>

16.575% <https://docplayer.ru/39792719-A-model-of-the-artificial-metastasis-of-human-epidermoi...>

6.2% <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=32526>

5.5% http://viroterapiya.com/lecheniye_raka_viroterapiy/lechenie_raka_virusom_sendai/

10.5% <https://scientificrussia.ru/articles/uchenye-so-ran-sozdali-prototip-sredstva-dlya-bo...>

10.5% <http://www.sbras.info/articles/science/umnyi-nakhodchivyi-akkuratnyi>

11.9% <http://docplayer.ru/39792719-A-model-of-the-artificial-metastasis-of-human-epidermoid...>

5.9% <https://dommedika.com/physiology/382.html>

9.1% <http://www.vector.nsc.ru/page/798/>

25.4% <https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/439>

13.7% <http://www.vector.nsc.ru/page/797/>

Оригинальность работы составляет ___92.66___ % , что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» на сайте www.antiplagius.ru
29.08.2018 г.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. К.В. Разум