

На правах рукописи



КОВАЛЬ ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
ТЕРАПИИ И МОДЕЛЕЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ИХ
ЭФФЕКТИВНОСТИ

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация в виде научного доклада
на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный консультант: Рихтер Владимир Александрович, к.б.н.,

Официальные оппоненты:

Макаров Александр Александрович, д.б.н., профессор, академик РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, научный руководитель института

Жарков Дмитрий Олегович, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», зав. лабораторией

Баклаушев Владимир Павлович, д.м.н.,

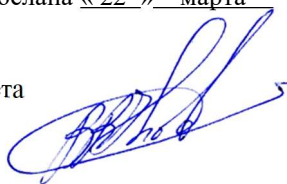
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», зам. генерального директора по научной работе и медицинским технологиям

Защита состоится «28» мая 2021 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ 03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, пр-кт акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Диссертация в виде научного доклада разослана « 22 » марта 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Онкологические заболевания являются существенной проблемой социально-экономического развития России. В связи с этим на первый план выходят задачи создания противоопухолевых агентов, обладающих высокой селективностью к опухолевым клеткам и оптимальным биораспределением, нейтральных по отношению к иммунной системе или стимулирующих противоопухолевый иммунитет и достаточно универсальных, чтобы охватить широкие группы пациентов. Таким требованиям максимально полно соответствуют продукты на основе онколитических вирусов и, в частности, вируса осповакцины. Помимо этого, в настоящее время активно развиваются плазменные методы электрофизического воздействия на опухолевые образования, приводящего к стимулированию химических реакций в газовой фазе и в жидкости на границе плазма – биологический объект, предполагающие широкую специфичность воздействия. С другой стороны, большое внимание уделяется разработке персонализированных подходов лечения, в том числе с использованием таргетных агентов, среди которых многообещающим является адоптивный перенос Т- и NK-клеток, продуцирующих химерные антигенные рецепторы (CAR). Усиление противоопухолевых свойств вирусных и клеточных препаратов может быть достигнуто путем модификации их геномов, например, введением определенных трансгенов. Полученные данные о цитотоксической активности белка молока человека, лактаптина, и его рекомбинантного аналога RL2, наработанного в клетках *E.coli*, позволили рассматривать RL2 как перспективный трансген для модификации геномов вируса осповакцины и NK-клеток (Некипелая с соавт., 2008; Koval *et al.*, 2012). Вместе с тем, несмотря на систематическое исследование лактаптина (Фомин с соавт., 2012; Koval *et al.*, 2014), ряд аспектов в механизме индукции клеточной гибели требовал дополнительных исследований.

Для доказательства универсальности одних подходов и избирательной селективности других, при тестировании активностей новых противоопухолевых препаратов и поиске новых потенциальных терапевтических мишеней требуется использовать разнообразный набор клеточных и опухолевых моделей. Следовательно, расширение спектра клеточных линий, обладающих туморогенностью при трансплантации животным и способных к метастазированию, за счет создания новых культур клеток является актуальной задачей.

Цель и задачи исследования. Основной целью настоящей работы являлась разработка новых молекулярно-биологических и физико-химических подходов

для противоопухолевой терапии на основе лактапина и технологии холодной плазменной струи, а также создание клеточных и опухолевых моделей для тестирования их активности *in vitro* и *in vivo*.

В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Получить новые клеточные и опухолевые модели для тестирования активности противоопухолевых и антиметастатических препаратов, в том числе таргетных.
2. Исследовать особенности индукции клеточной гибели аналогом лактапина RL2. Исследовать цитотоксический, противоопухолевый и антиметастатический потенциал препаратов на основе лактапина на экспериментальных опухолевых моделях.
3. Разработать противоопухолевый подход с использованием холодной плазменной струи.

Научная новизна

В данном исследовании реализован комплексный подход к исследованию новых противоопухолевых препаратов. Подход основан на создании клеточных и опухолевых моделей, которые далее использованы для исследования механизма и специфичности действия новых потенциальных противоопухолевых агентов. Впервые разработан метод “импульсной гипоксии” для направленной индукции мезенхимально-эпителиального перехода в культурах опухолевых клеток молочной железы человека. Получена и охарактеризована клеточная линия рака молочной железы человека, продуцирующая простат-специфический мембранный антиген (PSMA) человека, которая таким образом является PSMA-положительной метастатической моделью рака молочной железы. Выявлены особенности механизма индукции клеточной гибели аналогом лактапина RL2. Идентифицирован основной партнер RL2 среди белков в клетке – митохондриальный белок TOM70. Показано, что RL2 кратковременно индуцирует аутофагию/митофагию в опухолевых клетках и вызывает несогласованную регуляцию генов каскада NF-κB. Установлено, что RL2 индуцирует иммуногенный путь гибели опухолевых клеток. Впервые проведено комплексное исследование противоопухолевой и антиметастатической активности препаратов на основе аналогов лактапина. Показан высокий противоопухолевый потенциал рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, несущего трансгены лактапина и гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Продемонстрирован антиметастатический потенциал генно-модифицированной NK-клеточной линии человека YT – Cyto-CAR-YT-Lact, продуцирующей функциональный CAR против PSMA и несущей делецию гена Shp-2, и трансген, кодирующий аналог лактапина EL1. Проведены

исследования цитотоксического действия холодной плазменной струи (ХПС) в отношении опухолевых клеток человека и мыши с использованием заземленного электрода. Показано, что использование заземленного электрода значительно усиливает цитотоксический эффект ХПС.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Проведенное в работе исследование новых способов индукции мезенхимально-эпителиального перехода является существенным для понимания фундаментальных аспектов метастазирования. Выявление основных белков-регуляторов, запускающих разные формы гибели опухолевых клеток под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2, является важным для понимания молекулярно-биологических основ, обуславливающих предпочтительный путь клеточной гибели.

Полученные новые клеточные и опухолевые модели будут полезны для исследователей, работающих в области молекулярной онкологии и изучающих процессы канцерогенеза и опухолевой прогрессии, и при создании противоопухолевых препаратов. Особенности индукции гибели опухолевых клеток, выявленные в исследовании, позволяют направленно разрабатывать новые противоопухолевые подходы на основе лактапина. Полученные рекомбинантные ДНК для конструирования вирусов осповакцины могут быть использованы в дальнейшем для конструирования новых рекомбинантных штаммов вирусов. Противоопухолевый потенциал рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact стал основой для проведения успешных доклинических исследований препарата VV-GMCSF-Lact. Высокий антиметастатический потенциал модифицированных NK-клетки человека, продуцирующих аналог лактапина и несущих CAR к PSMA, делает их основой для создания подобных терапевтических генно-модифицированных линий из NK-клеток пациентов с метастатическими формами PSMA-положительного рака. Результаты, полученные при исследовании цитотоксической активности ХПС, позволяют оптимизировать условия генерации ХПС и проводить усовершенствование оборудования для достижения противоопухолевых эффектов *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Импульсная гипоксия индуцирует мезенхимально-эпителиальный переход клеток рака молочной железы человека в культуре.
- 2) Клеточная линия рака молочной железы человека, продуцирующая простат-специфический мембранный антиген, позволяет тестировать цитотоксическую, противоопухолевую и антиметастатическую активности таргетных к этому антигену препаратов *in vitro* и *in vivo*.
- 3) Клеточные модели эндометрия сохраняют рецепторный статус опухоли и позволяют изучать агонистические функции антиэстрогенов.

- 4) Митохондриальный белок TOM70 является основным среди белков-партнеров аналога лактапина RL2, обнаруживаемых количественными протеомными методами. Взаимодействие TOM70 с RL2 вызывает митофагию и гибель клеток по иммуногенному типу. Гибнущие клетки способны стимулировать противоопухолевый иммунный ответ *in vivo*.
- 5) Липосомальная форма рекомбинантного аналога лактапина RL2 подавляет формирование метастазов, а использование RL2 в сочетании с циклофосфамидом или хлорохином увеличивает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.
- 6) Введение гена лактапина в геном рекомбинантного вируса осповакцины и в геном модифицированных NK-клеток человека линии YT усиливает их противоопухолевый и антиметастатический потенциалы соответственно.
- 7) Технология холодной плазмы обладает потенциалом противоопухолевого воздействия.

Публикации и апробация работы

Основные результаты исследования отражены в 21 статье в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus; получены 6 патентов на изобретение РФ. Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: Cell Death and Regeneration (Дрезден, 2019); II Объединенный научный форум “VI съезд физиологов СНГ и VI съезд биохимиков России” (Дагомыс, 2019); 11-й симпозиум BGRS/SB (2018, Новосибирск); Cell Death in Disease: From Small Molecules to Translational Medicine (Санкт-Петербург, 2018); About Canonical, Non-canonical, and Immunogenic Cell Death: Basic Mechanisms and Translational Applications (Сеул, 2018); ESMO Immuno Oncology Congress (Женева, 2017); International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (Тайюань, 2017); New Concepts in Cell Death Research: From Basic Mechanisms to Clinical Opportunities (Жирона, 2016); Международная конференция “Химическая биология», посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016); Implementation of Knowledge of Cell Death (Прага, 2015); Mitochondria, Apoptosis and Cancer (Стокгольм, 2013); 20th ECDO conference: From Death to Eternity (Рим, 2012).

Различные аспекты диссертационной работы явились основанием для планирования новых научных тем, продолжающих данное научное направление.

Личный вклад автора

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии и руководстве на всех этапах исследования. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. В совместных работах автору принадлежит ключевая роль по планированию и

проведению экспериментов, обработке, оформлению и публикации результатов.

Особую признательность автор выражает к.б.н. Рихтеру В.А., который был инициатором и идеологическим координатором работы.

Частично эксперименты на опухолевых моделях на мышах проведены при участии к.б.н. Каледина В.И. и к.м.н. Николина В.П. (ИЦиГ СО РАН). Липосомы, содержащие RL2, получены к.х.н. Пышной И.А. (ИХБФМ СО РАН). Эксперименты по выявлению молекулярных механизмов индукции клеточной гибели рекомбинантным аналогом лактапина проведены при непосредственном участии сотрудников лаборатории д.б.н. Лаврик И.Н. (Институт Отто фон Герике, Магдебург, Германия). Электронная микроскопия выполнена сотрудниками группы микроскопических исследований д.б.н. Рябчиковой Е.И. (ИХБФМ СО РАН). Эксперименты по анализу влияния бенз[а]пирена на экспрессию микроРНК проведены совместно с к.б.н. Чанышевым М.Д. и д.б.н. Гуляевой Л.Ф. (НИИ Молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ).

Рекомбинантные вирусы осповакцины сконструированы, наработаны и очищены сотрудниками лаборатории д.б.н. Кочневой Г.В. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), совместно с которой проходило исследование свойств рекомбинантных вирусов.

Конструирование рекомбинантных ДНК и создание рекомбинантных CAR-NK клеток и модифицированных клеток-мишеней проведено к.б.н. Кулемзиным С.В., Субраковой В.Г. и к.б.н. Горчаковым А.А. под руководством д.б.н. Таранина А.В. (ИМКБ СО РАН).

Эксперименты по исследованию холодной плазмы спланированы и проведены совместно с д.ф.-м.н. Закревским Д.Э. (ИФП СО РАН) и д.ф.-м.н. Швейгерт И.В. (ИТПМ СО РАН).

Культуры клеток молочной железы и эндометрия человека были получены и охарактеризованы сотрудником лаборатории биотехнологии к.б.н. Нуштаевой А.А. под непосредственным руководством автора. Эксперименты по исследованию цитотоксической и противоопухолевой активности рекомбинантных аналогов лактапина RL2 и EL1 были выполнены совместно с сотрудником лаборатории биотехнологии к.б.н. Багаманшиной А.В.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка клеточных моделей для тестирования активности противоопухолевых и антиметастатических препаратов, в том числе таргетных

Для расширения арсенала клеточных линий, обладающих туморогенностью и способностью метастазировать, востребованных для тестирования активности новых противоопухолевых препаратов, а также для поиска новых потенциальных терапевтических маркеров, были получены новые клеточные

модели рака молочной железы (PMЖ) и эндометрия человека (Табл. 1). Источником биологического материала для получения культур клеток были непосредственно образцы ткани опухолей и нормальной ткани, полученные при хирургической резекции и диагностическом выскабливании.

1.1. Модели эндометрия

Методом ферментативной дезагрегации из образцов ткани эндометрия пациентов были получены персональные культуры клеток: 3 культуры клеток из образцов опухоли (EC1, EC2 и EC3); 1 культура клеток из ткани с признаками гиперплазии (HE) и культура клеток из нетрансформированной ткани эндометрия (KE) (Табл. 1).

Таблица 1. Характеризация молекулярных маркеров в персональных культурах клеток.

Культуры клеток	Фенотип исходной опухоли	Морф. культ. клеток	ERα	ERβ	PR	HER2	Cyp-19	Ki-67
культуры клеток эндометрия								
EC1	ER+/PR+	f	++	+	+	+	+	+
EC2	ER+/PR+	f/e	++	+	+	н/о	-	+
EC3	ER+/PR+	f	++	+	+	++	++	+
HE	н/о	f	+	+	+	н/о	-	+
KE	н/о	f/e	-	+	+	+	-	-
культуры клеток молочной железы								
BrC3e	ER+/PR+/HER2-	e	-	+	-	-	н/о	+
BrC4f	ER+/PR-/HER2-	f	-	-	-	++	н/о	-
BrC4e	ER+/PR-/HER2-	e	-	-	-	+	н/о	+
BC5	ER+/PR+/HER2+	e	-	+++	+	+	н/о	+
BrC6f	ER+/PR-/HER2-	f	-	-	-	++	н/о	-
BrC6e	ER+/PR-/HER2-	e	-	+	++	+	н/о	+
BrCCh1	ER+/PR+/HER2-	f	-	+	+	-	н/о	+++
BrCCh2e	ER+/PR-/HER2-	e	-	-	-	-	н/о	+
BrCCh3f	ER+/PR-/HER2-	f	+	-	++	-	н/о	+
BrCCh4e	ER-/PR-/HER2-	e	-	-	-	++	н/о	+
BN4	н/о	f	-	++	-	-	н/о	+

Примечание: f- фибробластоподобные; e-эпителиоподобные; н/о – не определяли; серым отмечены парные культуры клеток.

1.2. Модели PMЖ

Оптимизированным методом механической дезагрегации ткани были получены культуры онкотрансформированной ткани молочной железы человека (Табл. 1). Все клеточные линии обладали стабильными культуральными и морфологическими характеристиками. Культура клеток BrCCh4e депонирована в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской

коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург) с регистрационным номером РККК(П) 799Д.

1.2.1 Метод «импульсной гипоксии» для индукции мезенхимально-эпителиального перехода

Известно, что часть опухолевых клеток в процессе опухолевой прогрессии претерпевают переход из эпителиального в мезенхимальное состояние – эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), что позволяет опухолевым клеткам покидать в кровоток и перемещаться до места формирования метастатического узла, в котором опухолевая клетка должна пройти обратную – мезенхимально-эпителиальную трансформацию (МЭП). Состояние гипоксии является одним из сильных трансформирующих факторов, стимулирующих ЭМП, но для обратного, мезенхимально-эпителиального перехода, ранее не было показано подобной стимулирующей активности. Мы продемонстрировали, что четыре раунда смены концентрации кислорода от нормы до слабой гипоксии при культивировании фибробластоподобных клеток BrC4f и BrC6f приводили к смещению их фенотипа в сторону округлых эпителиоподобных клеток с получением дочерних культур BrC4e и BrC6e (Рис. 1А; Табл. 1). Условия культивирования клеток со сменой концентрации O_2 от нормальной до гипоксии были названы «импульсной гипоксией».

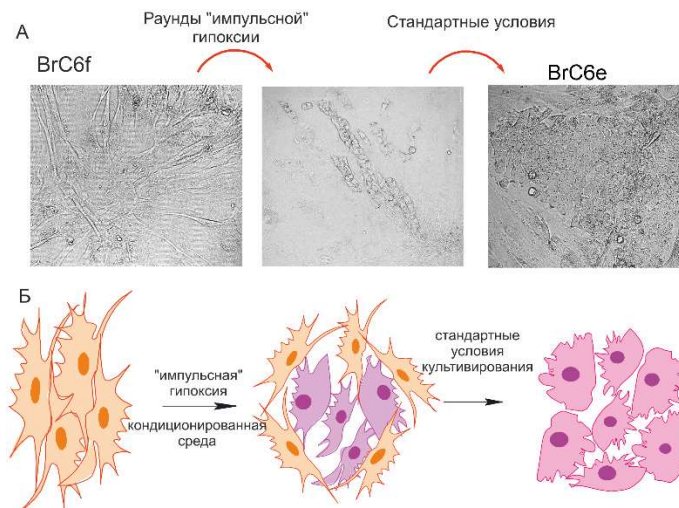


Рис. 1. Стадии трансформации фибробластоподобных клеток в эпителиоподобные в первичных культурах РМЖ. (А) Фазово-контрастная микроскопия культур BrC6f и BrC6e. (Б) Схематическое изображение наблюдаемой трансформации.

Продолжительность каждого раунда гипоксии составляла от 24 до 48 ч, промежутки между раундами гипоксии составляли 48-72 ч. На Рис. 1Б изображена схема наблюдаемой трансформации фенотипа клеток при «импульсной гипоксии», морфологически соответствующая МЭП.

1.3. Характеристика полученных культур клеток

Современные подходы лечения злокачественных опухолей молочной железы (ЗОМЖ) и эндометрия (ЗОЭ) учитывают молекулярные подтипы опухолей. Классификация молекулярных подтипов ЗОМЖ основана на продукции клетками опухоли рецепторов эстрогенов ER α и ER β , рецептора прогестерона (PR) и тирозинкиназы HER2. Также при классификации подтипа учитывают маркер пролиферации клеток Ki-67. Для определения молекулярного профиля полученных культур клеток эндометрия и молочной железы был проведен анализ уровней мРНК генов, кодирующих рецепторы ER α , ER β , PR и белок Ki-67, методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени на 2–3-м пассажах с использованием специфических праймеров. Дополнительно для культур эндометрия анализировали экспрессию мРНК ароматазы (Cyp19).

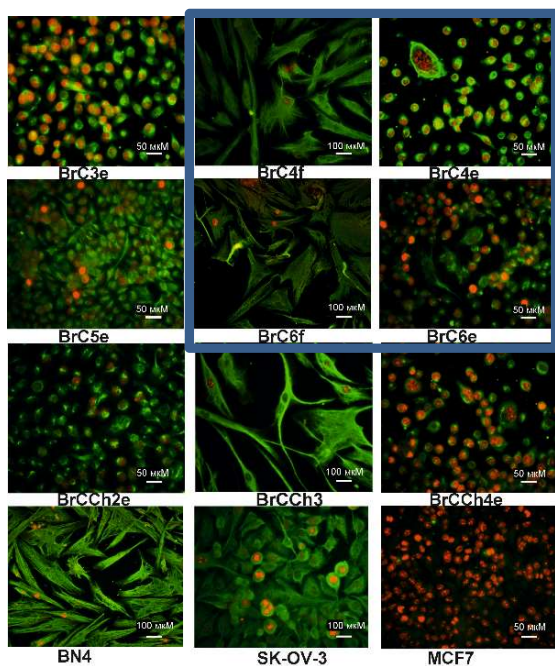


Рис. 2. Анализ уровней Ki-67 и виментина в клетках культур молочной железы человека.

Иммунофлуоресцентная визуализация Ki-67 и виментина в клетках культур молочной железы. При анализе уровня виментина в качестве положительного и негативного контролей использовали клетки аденокарциномы яичника SK-OV-3 и клетки MCF-7 человека, соответственно. Красный сигнал – Ki-67, зеленый – виментин. В рамке отмечены парные культуры клеток

Представленность рецепторов HER2 в культурах клеток эндометрия и молочной железы анализировали методом проточной цитометрии с

применением моноклональных антител. Сравнение представленности рецепторов стероидных гормонов в образцах опухолей и в полученных культурах клеток позволяет сделать вывод о том, что при переходе в культуру клетки эндометрия лучше сохраняют профиль экспрессии рецепторов стероидных гормонов, чем клетки молочной железы (Табл. 1). Из образцов ЗОМЖ удалось получить опухолевые линии с различными базовыми фенотипами от гормон-положительной и HER2⁺ культуры клеток BC5 до культуры трижды негативного рака молочной железы BrCCh2e, что позволяет говорить о представленности всех основных молекулярных фенотипов ЗОМЖ в панели полученных культур клеток (Табл. 1).

Иммунофлуоресцентная визуализация распределения виментина в клетках культур ЗОМЖ с применением моноклональных антител подтвердила эпителиальный и мезенхимальный фенотипы полученных культур клеток (Рис. 2). Дополнительное иммуноокрашивание с применением антител к белку Ki-67 показало, что уровень Ki-67 в культурах клеток BrC4e и BrC6e, прошедших МЭП выше, чем в родительских линиях клеток BrC4f и BrC6f.

При эпителиально-мезенхимальном переходе разрушаются адгезионные контакты, щелевые контакты и филаменты базальной мембраны, клетки становятся подвижными, экспрессия гена Е-кадгерина, формирующего адгезионные контакты, подавляется, и вместо него экспрессируется ген N-кадгерина (Kang and Massagué, 2004). Кроме того, происходят перестройки в цитоскелете, поскольку вместо генов цитокератинов экспрессируются гены виментина и фибронектина (Micalizzi *et al.*, 2010). Продукция молекулы адгезии эпителиальных клеток, EpCAM увеличена в 100-1000 раз в эпителиальных клетках ЗОМЖ (Osta *et al.*, 2004), тогда как гиперпродукция молекулы адгезии

Таблица 2. Представленность поверхностных маркеров ЭМТ и MET в полученных персональных культурах ЗОМЖ.

Персональная культура клеток	Доля положительных клеток, %			
	Mel-CAM (CD146)	EpCAM (CD326)	Е-кад (CD324)	N-кад (CD325)
BrC3e	34.9	98.2	97.0	10.2
BrC4e	33.4	99.0	76.6	нег
BrC5e	23.9	99.0	73.0	нег
BrC6e	42.6	99.0	78.4	нег
BrC4f	96.0	9.7	1.2	85
BrC6f	91.0	20.9	5.6	74
BrCCh3f	93.6	нег	нег	66
BrCCh2e	65.7	60.4	58.1	20.0
BrCCh4e	71.5	97	89	8.8

Примечание: Е-кад – Е-кадгерин; N-кад – N-кадгерин; нег – негативные.

меланомы, Mel-CAM, характерна для мезенхимальных клеток ЗОМЖ (Jang *et al.*, 2015). Анализ содержания маркеров эпителиально-мезенхимального

перехода методом проточной цитофлуориметрии показал, что их представленность в клетках культур ЗОМЖ строго коррелирует с морфологией клеток (Табл. 2). В фибробластоподобных клетках выявлено высокое содержание Mel-CAM-положительных и N-кадгерин-положительных клеток в сочетании с низким содержанием ЕpCAM- и Е-кадгерин-положительных клеток. Эпителиальные клетки демонстрируют «обратный» фенотип с низким содержанием Mel-CAM и N-кадгерина и высоким содержанием ЕpCAM и Е-кадгерина. Соотношение N-кадгерина, Е-кадгерина, Mel-CAM и ЕpCAM в родительских культурах BrC4f и BrC6f и в индуцированных гипоксией культурах BrC4e и BrC6e подтверждало реализацию мезенхимально-эпителиального перехода.

1.4. Персональные культуры ЗОМЖ с эпителиоподобным фенотипом туморогенны в иммунодефицитных мышах

Для оценки туморогенности полученных культур опухолевых клеток молочной железы *in vivo*, клетки опухолевых культур подкожно перевивали мышам линии SCID. В результате трансплантации только три культуры клеток, а именно BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e, вызвали рост опухоли на месте подкожного введения. Эти культуры клеток имеют эпителиоподобный фенотип, содержат молекулярные маркеры эпителиальных клеток и имеют женский псевдотриплоидный набор хромосом. При исследовании гистологических срезов полученных опухолей обнаружены структуры, подобные структурам в молочной железе, – дольки с прослойками соединительной ткани; однако в опухолях, в отличие от нормальной молочной железы, наблюдали тканевой и клеточный атипизмы (Рис. 3). При патологоанатомическом осмотре животных-опухоленосителей было обнаружено, что опухоль BrCCh4e метастазировала в лимфатические узлы средостения.

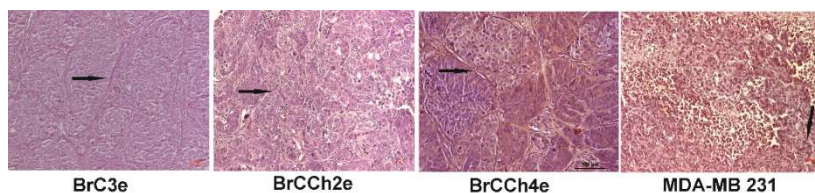


Рис. 3. Гистологический анализ препаратов опухолей BrC3e, BrCCh2e, BrCCh4e и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231. Стрелками указана соединительнотканная капсула.

Таким образом, при подкожной трансплантации опухолевых клеток BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e формируются солидные опухоли, проявляющие внешние признаки онкотрансформированной молочной железы, что позволяет рассматривать эти культуры клеток опухолевыми моделями молочной железы

человека. Обнаружение метастатических очагов опухоли BrCCh4e позволяет считать культуру клеток BrCCh4e подходящей моделью для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе метастазирования опухолей молочной железы в лимфатические узлы, а также для тестирования не только противоопухолевых, но и антиметастатических препаратов.

1.5. Получение метастазирующей клеточной линии, продуцирующей простатический специфический мембранный антиген (PSMA) для оценки потенциала препаратов таргетной терапии

Присутствие белка PSMA характерно для большинства видов рака предстательной железы (РП), а его уровень коррелирует со степенью тяжести заболевания, в том числе с метастатическими формами (Damber *et al.*, 2008). Метастазы РП наиболее часто локализованы в костях (более 90% случаев) (Bubendorf *et al.*, 2000). Такой тип метастазирования сохраняется для внутривенно перевиваемых клеточных линий РП, в том числе линий PC-3, VCaP, DU145 и LNCaP. Регресс метастазов в костях диагностируют рентгенологическим методом по снижению уровня накопления радиофармпрепаратов, что требует наличия определенного оборудования. При внутрисердечной имплантации часть из этих клеток формируют метастазы и в костях, и других отдаленных органах, однако данный метод трансплантации является трудоемким и небезопасным для животного. Эти особенности получения и визуализации метастатических моделей при использовании клеточных линий РП создают трудности при анализе антиметастатического потенциала PSMA-таргетных препаратов на модельных животных. Поскольку для опухолей, образованных клетками линии BrCCh4e, характерно метастазирование в лимфоузлы средостения при подкожной трансплантации, эти линии были использованы для получения соответствующей PSMA-положительной клеточной модели. Линия BrCCh4e-134, продуцирующая PSMA в качестве трансгена, была получена методом лентивирусной трансдукции. В результате трансдукции и последующего клонирования методом проточной сортировки была получена клеточная линия BrCCh4e-134 с гиперпродукцией PSMA, которая являлась PSMA-положительной метастатической моделью ЗОМЖ при трансплантации иммунодефицитным животным. Данная клеточная линия была использована также для анализа таргетных противоопухолевых препаратов.

1.6. Чувствительность клеток культур эндометрия и молочной железы человека к противоопухолевым агентам и канцерогенам

1.6.1. Чувствительность клеток культур эндометрия к противоопухолевым агентам и канцерогенам

Для оценки чувствительности клеток эндометрия к противоопухолевым препаратам были выбраны доксорубин, цисплатин, рекомбинантный аналог лактапина RL2, а также ингибиторы фермента ароматазы анастразол и эксеместан. Анализ их цитотоксического действия показал, что клетки культуры нетрансформированного эндометрия KE обладали самой низкой чувствительностью к доксорубину, цисплатину и RL2 (Табл. 3). Все культуры клеток, полученные из опухолевой ткани, имели близкие значения IC₅₀ (концентрация препарата, вызывающая гибель 50% клеток) для RL2, лежащие в диапазоне 350±30 мкг/мл. Культура клеток EC3 с высоким уровнем экспрессии мРНК ароматазы проявляла чувствительность к ингибитору ароматазы эксеместану.

Персональные культуры являются не только потенциальным инструментом для тестирования чувствительности к цитостатикам, но и позволяют оценивать различия между нетрансформированными и раковыми клетками в ответ на экзогенные канцерогены. Известно, что ксенобиотики способны изменять паттерн синтезируемых микроРНК. Линии клеток KE и EC3 были использованы для оценки изменения профиля микроРНК после воздействия бенз[а]пирена (БП). БП способен связываться в клетках с эстрогеновыми рецепторами (Charles et al., 2000). В исследовании оценивали уровни тех микроРНК, которые потенциально могут быть вовлечены в каскад реакций ответа на БП, – miR-21, -126, -190a, -221 и -222. Относительные уровни вышеуказанных микроРНК в

Таблица 3. Индексы цитотоксичности (IC₅₀) противоопухолевых препаратов и RL2, определенные для культур клеток эндометрия человека.

Культура клеток	IC ₅₀				
	Доксорубин, μ М	Цисплатин, мкг/мл	RL2, мкг/мл	Анастразол, мкМ	Эксеместан, мкМ
EC1	0.21 ± 0.06	7.5 ± 2.3	380±40	-	-
EC2	0.16 ± 0.05	1.97± 0.81	320±60	-	-
EC3	0.29 ± 0.01	1.54± 0.57	340±40	346±41	450±34
HE	2.01 ± 0.23	43.20±4.63	570±80	350±21	598±19
KE	> 50	69.04 ± 2.82	680±30	-	-

Примечание: значения IC₅₀ представлены как среднее значение ± SD.

культурах клеток были определены методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров. Было обнаружено, что обработка культур клеток KE и EC3 бенз[а]пиреном в концентрации 0.1 мкМ и 1 мкМ достоверно снижала содержание miR-126 в обеих клеточных линиях. В клетках культуры EC3 БП дозозависимо индуцировал увеличение уровня miR-190a. Таким образом было показано, что культура клеток нормального эндометрия более чувствительна к действию БП на уровне регуляции miR-190a. Известно, что нарушение регуляции miR-190a при различных онкологических

заболеваниях взаимосвязано с нарушениями пролиферации, апоптоза, метастазирования и лекарственной устойчивости (Yu and Cao, 2019). В соответствии с полученными данными, можно дополнить указанный список процессов изменением чувствительности к генотоксическим ксенобиотикам на примере БП. Таким образом, персональные культуры клеток трансформированного и здорового эндометрия, экспрессирующие рецепторы стероидных гормонов, могут быть использованы для исследования механизмов канцерогенеза, взаимосвязанного с этими рецепторами.

1.6.2. Чувствительность клеток культур молочной железы человека к противоопухолевым агентам и иммуномодуляторам

Химиопрепараты: доксорубицин, цисплатин, афинитор, метотрексат, паклитаксел и хлорохин были использованы для выявления резистентных и чувствительных культур клеток молочной железы; значения IC₅₀, рассчитанные для этих препаратов приведены в Табл. 4. Наиболее чувствительными к исследуемым препаратам были клетки BrC6e, полученные методом «импульсной гипоксии», тогда как их родительская культура BrC6f обладала широким спектром устойчивости.

Таблица 4. Цитотоксическая активность химиопрепаратов в отношении персональных культур клеток ЗОМЖ (IC₅₀).

IC ₅₀ , μM						
Культура	Доксо- рубицин	Циспла- тин	Афинитор	CQ	Пакли- таксел	Мето- трексат
BrC3e	5.6	4.7	64.9	17.3	<2	> 150
BrC4f	5.8	9.7	> 200	<5	> 50	> 150
BrC4e	0.7	> 50	62.5	42.1	<2	113.1
BrC5e	1.0	> 50	> 200	<5	<2	> 150
BrC6f	0.4	> 50	> 200	<5	29.6	> 150
BrC6e	0.1	1.8	13.2	10.1	<2	<10
BrCCh2e	3.1	6.5	68.0	13.4	<2	7.3
BrCCh3f	> 20	> 50	н/д	<5	9.4	> 150
BrCCh4e	0.9	7.3	164.2	<5	<2	54.3
BN4	> 20	3.4	> 200	> 100	> 50	> 150

Примечание: CQ – хлорохин.

На основании данных, представленных в табл. 4 и данных о фенотипе культур клеток (Табл. 2) можно заключить, что именно фибробластоподобные клетки с мезенхимальными маркерами проявляют устойчивость к действию

широкого спектра химиопрепаратов. Полученные парные культуры с фибробластоподобным и эпителиальным фенотипом, моделирующие мезенхимально-эпителиальную трансформацию опухолевых клеток, подтверждают взаимосвязь мезенхимального фенотипа с лекарственной устойчивостью и являются важной моделью при исследовании механизмов опухолевой прогрессии и резистентности к противоопухолевым препаратам.

Чувствительность полученных культур клеток ЗОМЖ к иммуномодуляторам оценивали на примере препарата рекомбинантного интерферона альфа человека (ИФНа). Для сравнения клеточного ответа использовали иммортализованные культуры клеток молочной железы. Было установлено, что как среди иммортализованных культур, так и среди полученных персональных культур, наиболее чувствительными к действию ИФНа были опухолевые клетки с эпителиальным фенотипом - MCF-7 и BC5, соответственно (Рис. 4). В то же время, можно отметить как общую тенденцию

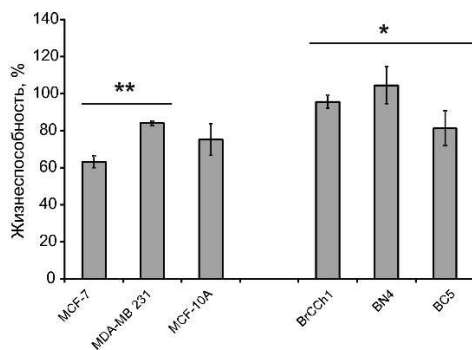


Рис. 4. Влияние ИФНа на жизнеспособность культур клеток молочной железы человека. Клетки обрабатывали ИФНа (220 МЕ/мл) и определяли их жизнеспособность с помощью МТТ-теста через 48 ч после обработки. Данные представлены относительно образцов необработанных (контрольных) клеток как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение в трех независимых экспериментах. Разница между группами была статистически значимой при $p < 0.05$ (*) и при $p < 0.01$ (**).

культур клеток молочной железы их низкую чувствительность к ИФНа, что не позволяет использовать ИФНа как препарат первой линии в клинической практике при терапии ЗОМЖ.

2. Разработка противоопухолевых подходов на основе лактапина

2.1. Исследование механизма действия рекомбинантного аналога лактапина RL2

Ранее, в пилотных исследованиях механизма клеточной гибели под действием аналога лактапина RL2, цитотоксического фрагмента к-казеина молока человека, было показано, что гибель клеток сопровождается характерными для апоптоза изменениями. Они включают транслокацию фосфатидилсерина с внутренней поверхности плазматической мембраны на внешнюю, изменение трансмембранного потенциала митохондрий, активацию каспаз -7, -8 и -9, и олигонуклеосомную фрагментацию ДНК (Semenov *et al.*,

2010; Фомин с соавт., 2012). Анализ транскриптома клеток MCF-7, обработанных RL2, показал, что под действием этого препарата происходит повышение экспрессии гена-онкосупрессора *TP53*, наряду с повышением экспрессии группы генов, участвующих в р53-зависимом ответе клетки на повреждение ДНК, что указывало на остановку клеточного цикла в фазах G2/M или S/G2 (Фомин с соавт., 2012). Тем не менее, для рационального поиска препаратов-партнеров и разработки новых терапевтических форм аналогов лактапина этих данных оказалось недостаточно, что привело к необходимости более полно исследовать механизм гибели клеток под действием RL2.

Клеточный ответ каскада Nf-κB является одним из ключевых неспецифических ответов иммунной системы на различные стимулы – воспалительные цитокины и продукты вирусного или бактериального происхождения, он вовлечен в каскады, регулирующие пролиферацию клетки и апоптоз. Транскрипция генов *IκBα*, *A20* и *CXCL1* находится под контролем Nf-κB, а белки IκBα и A20 образуют инактивирующий комплекс с Nf-κB. Активация клеточного ответа Nf-κB сопровождается положительной регуляцией синтеза мРНК *IκBα*, *A20* и *CXCL1*. Для того чтобы исследовать влияние аналога лактапина RL2 на экспрессию генов *IκBα*, *A20* и *CXCL1* в раковых клетках в сравнении с нетрансформированными здоровыми клетками, в качестве моделей использовали опухолевую линию клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и линию нетрансформированных клеток нормального эндометрия человека KE, резистентную к RL2 (Табл.3). Из

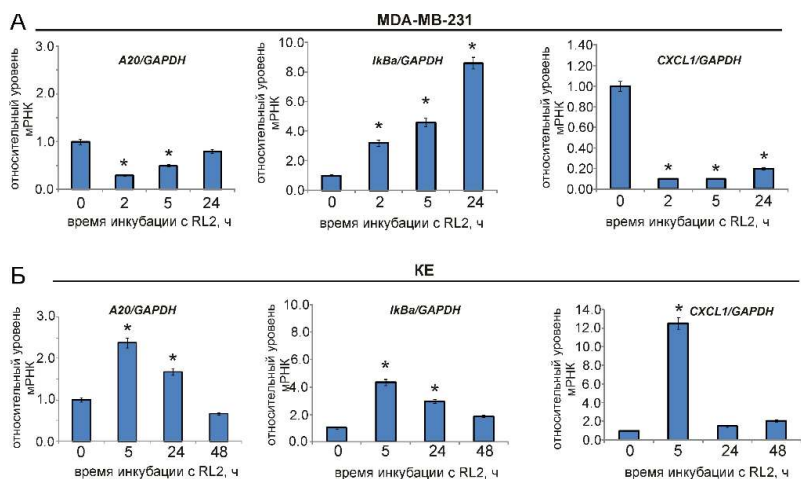


Рис. 5. Относительный уровень мРНК *CXCL1*, *A20* и *IκBα* в культурах клеток MDA-MB-231 (А) и нетрансформированного эндометрия человека KE (Б), инкубированных с RL2 (0.35 мг/мл) в течение 0–48 ч. Уровень мРНК *GAPDH* использовали в качестве

внутреннего стандарта. Соотношение мРНК целевого гена/мРНК *GAPDH* в контрольных клетках принимали за единицу. Данные ОТ-ПЦР представлены как среднее значение соотношения мРНК целевого гена/мРНК *GAPDH*±SD.

данных, представленных на Рис. 5, можно видеть, что изменения экспрессии этих генов под действием RL2 различны для раковых и здоровых клеток. Инкубация с RL2 клеток KE приводила к повышению уровней мРНК *A20* и *IκBα* и *CXCL1*, указывая на согласованную кратковременную активацию каскада Nf-κB. В случае клеток MDA-MB-231 происходит активация экспрессии только одного из трех исследуемых Nf-κB-зависимых генов – *IκBα*, и негативная регуляция экспрессии мРНК *A20*, и такой несогласованный ответ может вести к дисбалансу белков каскада Nf-κB, активируя каскады клеточной гибели, в том числе отличные от классического апоптоза. Можно предположить, что значительное снижение содержания мРНК *A20* в RL2-обработанных раковых клетках MDA-MB-231 вызывает нарушение негативной регуляции Nf-κB и способствует развитию апоптоза, а увеличение содержания мРНК *A20* в клетках нормального эндометрия KE повышает их выживаемость и носит антиапоптотический характер.

Попадание в клетку противоопухолевых агентов может сопровождаться не только индукцией апоптоза, но и запуском аутофагии. По отношению к опухолевым клеткам аутофагия может способствовать подавлению роста опухоли за счет элиминации онкогенных белковых субстратов, токсичных белков и поврежденных органелл. В то же время именно аутофагия обеспечивает опухолевую клетку метаболитами для жизнедеятельности при недостатке внешних питательных ресурсов и поддерживает пул функциональных митохондрий. Детекция аутофагии может осуществляться как непосредственным наблюдением аутофагосом методом электронной микроскопии, так и по изменению основных молекулярных маркеров. Для аутофагического типа клеточной гибели характерно накопление аутофагосом, процессинг белка LC3 и изменение уровня белков: p62, Beclin1 и белков семейства ATG.

Для визуализации в препаратах клеток, инкубированных с RL2, клеток с признаками аутофагии, а именно с фагофорами, миелоноподобными структурами, мультивезикулярными тельцами и аутофагосомами, использовали метод трансмиссионной электронной микроскопии. На Рис. 6А-В видны аутофагосомы на стадии формирования фагофора и зрелые аутофагосомы в препаратах клеток MDA-MB-231, обработанных RL2. Анализ относительного числа аутофагосом выявил увеличение доли этих структур в образцах, инкубированных с RL2 в течение 4 ч (Рис. 6Г), что указывает на индукцию аутофагии в клетках под действием RL2. Кроме того, в клетках, обработанных RL2, наблюдали появление процессированной формы белка LC3I – LC3II, что является характерным молекулярным маркером, ассоциированным с

аутофагией (Рис. 7). При исследовании других белков аутофагического каскада показано снижение уровней белков p62 и Beclin 1 и, кроме того, увеличение уровня ATG5 на ранних этапах инкубации клеток с RL2 (Рис. 7). Снижение уровня p62 и увеличение уровня ATG5 свидетельствуют об активации аутофагии. Снижение уровня Beclin 1 при длительной инкубации с RL2, по-видимому, говорит о его расходе в иницирующем комплексе, а также о

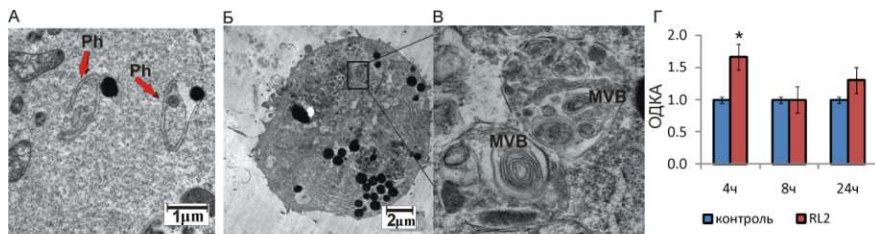


Рис. 6. Анализ ультраструктуры клеток MDA-MB-231, обработанных RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 4–24 ч и анализировали методом трамиссионной электронной микроскопии. (А) Формирование фагофоров в клетках, инкубированных с RL2 в течение 4 ч. Ph – фагофор. (Б) Клетка с многочисленными аутофаголизосомами. (В) Фрагмент клетки с миелоноподобными структурами и фрагментом цитоплазмы. MVB – мультивезикулярные тельца. (Г). Относительная доля клеток с признаками аутофагии (ОДКА). ОДКА в контрольных необработанных клетках принимали за единицу. Данные представлены как относительное среднее значение $\pm$ SD. * – $p < 0.05$.

возможном расщеплении каспазы-3, приводящем к супрессии аутофагии и гибели клетки по пути апоптоза. Полученные данные позволяют заключить, что RL2 на ранних стадиях инкубации активирует аутофагический каскад в опухолевых клетках, но далее равновесие сдвигается в пользу апоптоза.

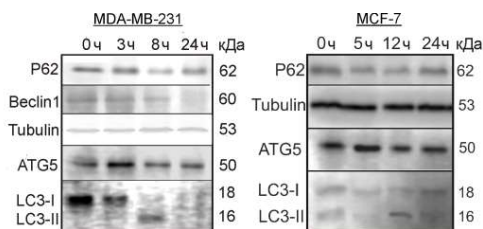


Рис. 7. Вестерн-блот анализ белков - маркеров аутофагии в клетках MDA-MB-231 и MCF-7, инкубированных с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 0 – 24 ч. Характерный пример анализа.

Для анализа направленности аутофагии на выживание или гибель клетки под действием RL2, применяли ингибитор аутофагии хлорохин (CQ). Опухолевые клетки инкубировали с CQ в моно-режиме и в комбинации с RL2. Показано, что комбинация CQ и RL2 вызвала цитотоксический эффект,

превышающий эффекты моно-обработки этими препаратами, и приводила к синергическому эффекту (Рис. 8), что указывает на возможность использования данной комбинации для терапии RL2- чувствительных опухолей *in vivo*.

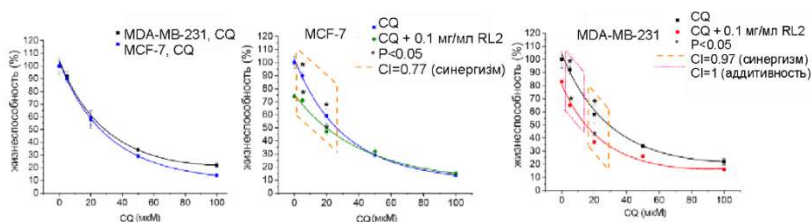


Рис. 8. Жизнеспособность клеток MDA-MB-231 и MCF-7 под действием хлорохина (CQ) и в комбинации с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.1 мг/мл) и CQ (0 – 100 μM) в течение 48 ч. Данные жизнеспособности представлены как относительное среднее значение (%) ± SD по сравнению с контрольными клетками, обработанными фосфатным буфером PBS.

Для поиска внутриклеточных белков-мишеней аналога лактапина RL2, проводили аффинную хроматографию лизатов клеток MDA-MB-231, используя RL2-сефарозу в качестве сорбента, а далее идентифицировали связавшиеся белки методом масс-спектрометрии (Рис. 9). Обнаруженные белки представлены на Рис. 9А. В качестве основного партнера, взаимодействующего с RL2, был выявлен митохондриальный белок TOM70, а также белки TIM8A и TIM8B, помимо актинина 1 и тубулина, обнаруженных ранее (Koval *et al.*, 2014). Белки семейств TOM и TIM относятся к комплексу митохондриальных транслоказ, которые обеспечивают импорт митохондриальных белков внутрь органеллы и играют существенную роль в продукции АТФ митохондриями и в функционировании дыхательной цепи. Специфическое взаимодействие TOM70 с RL2 было подтверждено методом иммунопреципитации лизатов клеток, обработанных RL2, с антителами к TOM70, иммобилизованными на магнитных частицах (Рис. 9 В). Взаимодействие RL2 с TOM70 может приводить к нарушению импорта митохондриальных белков и баланса АТФ в клетке. После обработки клеток RL2 было выявлено снижение концентрации АТФ в клетках MDA-MB-231 (Рис. 9 Г). Таким образом, в результате формирования комплекса RL2•TOM70 происходит снижение содержания АТФ, нарушение импорта митохондриальных белков и TOM70-зависимое снижение митохондриального потенциала, что может вести к гибели RL2-обработанных клеток.

Дополнительное исследование маркеров стресса митохондрий в клетках MDA-MB-231 представлено на Рис.10А, Б. В клетках, обработанных RL2, содержание активных форм кислорода повышалось по сравнению с контрольными клетками (Рис. 10А). Контроль качества митохондрий осуществляет PTEN-индуцируемая киназа PINK1, взаимодействующая с

комплексом TOM. На поврежденных митохондриях формируется комплекс PINK1•PARKIN, активирующий формирование аутофагосомы вокруг такой митохондрии и ее деградацию по пути митофагии – специфической аутофагии митохондрий. Наблюдаемая позитивная регуляция белка PINK1 при инкубации

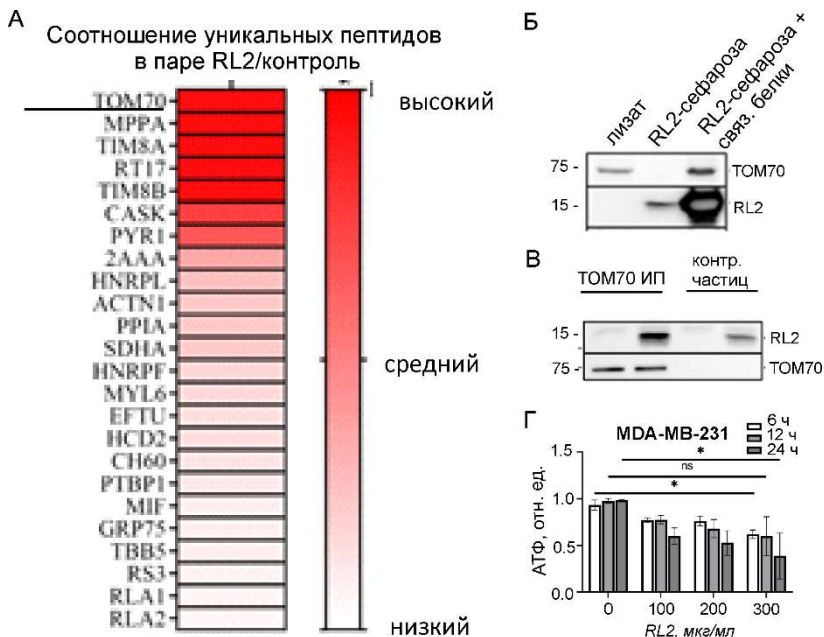


Рис. 9. RL2 взаимодействует с митохондриальным белком TOM70. Масс-спектрометрическая идентификация кандидатных белков-партнеров RL2 в клетках MDA-MB-231 (А), иммуноанализ связывания белков лизата с RL2-сефарозой (Б), подтверждение взаимодействия TOM70 с RL2 методом иммунопреципитации лизатов клеток с магнитными частицами с иммобилизованными антителами к TOM70. (Г) Изменение содержания АТФ в клетках после обработки RL2. А. Уровень АТФ представлен как среднее значение в относительных люминесцентных единицах (отн. ед.). * $p < 0.05$; **** - $p < 0.001$; ns – различия недостоверны.

клеток с RL2 (Рис. 10Б), подтверждает индукцию стресса митохондрий под действием RL2. На рис. 10В можно видеть захват митохондрий в аутофагосомы в клетках, обработанных RL2. Истощение пула функциональных митохондрий ведет к нарушению клеточного гомеостаза и вносит вклад в стимуляцию гибели опухолевой клетки. На основании полученных данных предложена схема, объясняющая развитие аутофагии и апоптоза в клетках, обработанных RL2.

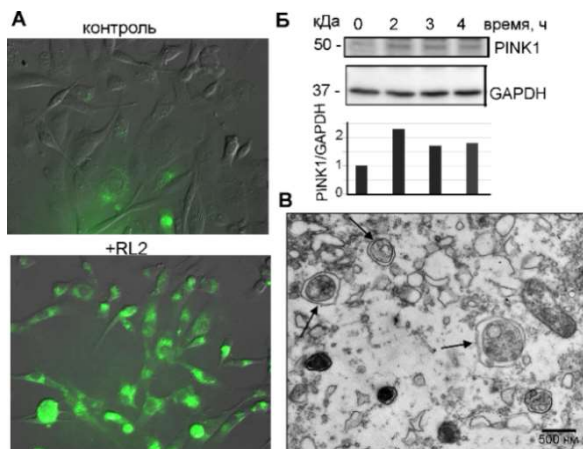


Рис. 10. Изменение маркеров стресса митохондрий в клетках MDA-MB-231. Клетки были обработаны RL2 (0.2 мг/мл). **(А)** Анализ активных форм кислорода с помощью флуоресцентного индикатора DCFDA (зеленый сигнал) через 3 ч инкубации. **(Б)** Анализ белка PINK1 методом вестерн-блота. **(В)** Ультроструктура клеток, обработанных RL2. Стрелками отмечено формирование аутофасом вокруг митохондрий.

(Рис. 11). Согласно этой схеме на ранних этапах инкубации с RL2 в клетках преобладают процессы аутофагии/митофагии, направленные на выживание клетки, а далее равновесие сдвигается в сторону клеточной гибели.

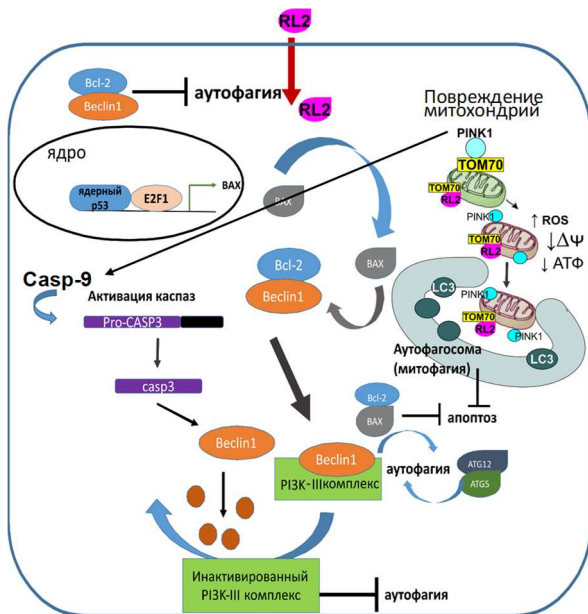


Рис. 11. Схема регуляции RL2-индуцированных процессов аутофагии/митофагии и апоптоза в опухолевой клетке.

Уменьшение содержания клеточного АТФ, помимо снижения эффективности синтеза, может происходить вследствие усиленного расходования АТФ или его выхода во внеклеточное пространство. Выход АТФ во внеклеточное пространство при гибели клетки является одним из признаков иммуногенного типа клеточной гибели (ICD). При иммуногенном типе клеточной гибели происходит активация и созревание дендритных клеток, презентация опухолевых антигенов CD4⁺-клеткам, созревание Т-клеток-эффекторов, направленных на опухолевые антигены и формирование Т-клеток памяти, что в совокупности стимулирует формирование специфического противоопухолевого иммунного ответа. Поэтому для клеток, обработанных RL2, был проведен анализ характерных маркеров иммуногенного типа клеточной гибели, какими являются выход АТФ и белка HMGB1 во внеклеточное пространство, а также транслокация кальретикулина (CRT) и HSP70 на внешнюю клеточную мембрану. Показано, что инкубация клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и рабдомиосаркомы мыши MX-7 с RL2 индуцирует все перечисленные характерные изменения, что достаточно для того, чтобы считать гибель клеток иммуногенной (Рис. 12).

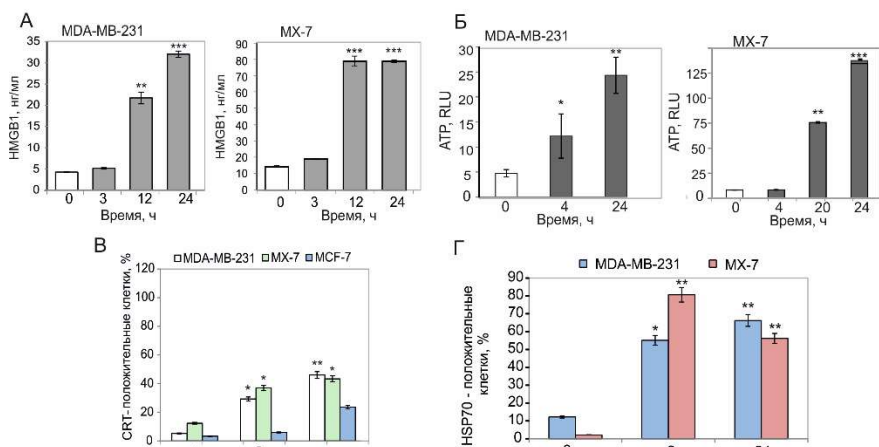


Рис. 12. Маркеры иммуногенного типа гибели в клетках, инкубированных с RL2. Клетки MDA-MB-231, MCF-7 и MX-7 инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл, 2–24 ч). **(А)** Концентрация внеклеточного HMGB1. **(Б)** Анализ уровня внеклеточного АТФ (ATP). **(В)** Доля CRT⁺ клеток по данным проточной цитометрии; **(Г)**. Доля HSP70⁺ клеток по данным проточной цитометрии. Отличие от контроля достоверно: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Для анализа формирования противоопухолевого ответа *in vivo*, клетки рабдомиосаркомы мышей MX-7 инкубировали с RL2 *in vitro* и

трансплантировали сингенным мышам. Контрольным животным трансплантировали живые опухолевые клетки (Рис. 13). Через 10 дней после первой трансплантации, всем животным трансплантировали живые опухолевые клетки. Вакцинирующий противоопухолевый иммунный ответ оценивали по доле животных без вторичной опухоли. Показано, что клетки, обработанные RL2, вызывали вакцинирующий эффект в 50% случаев, как и клетки, обработанные доксорубицином (Dox), подтвержденным индуктором ICD. Таким образом, опухолевые клетки, гибнущие под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2 способны стимулировать специфический противоопухолевый иммунный ответ.

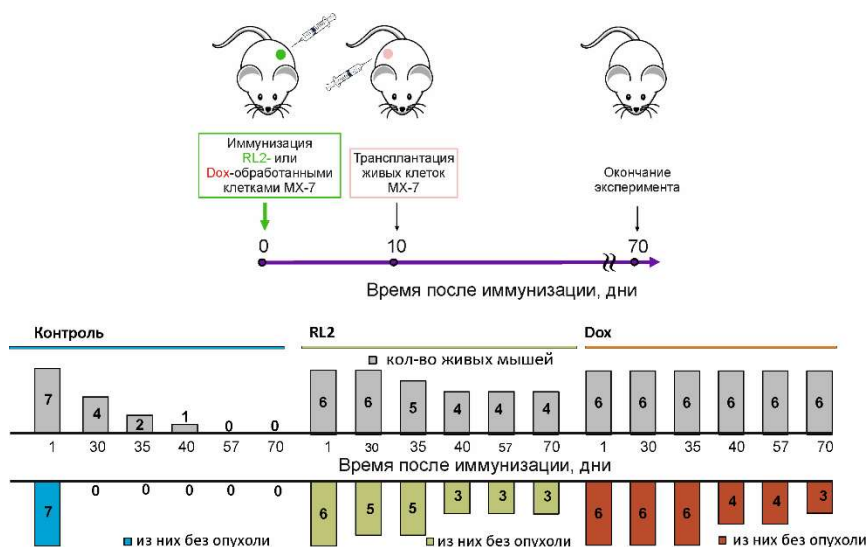


Рис. 13. Иммунизирующий эффект клеток MX-7, обработанных RL2. Схема иммунизации. Мышам линии СЗН/Не подкожно вводили клетки MX-7 (7×10^5 клеток/мышь), живые и обработанные RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч) или доксорубицином (Dox, 0.1 мкг/мл, 24 ч) в качестве положительного контроля. Выживаемость вакцинированных животных. Различия между группами оценивали с помощью непараметрической статистики в тесте Пирсона Хи-квадрат, различия были достоверны при $p < 0.05$.

2.2. Подходы, направленные на усиление противоопухолевого действия аналога лактапина RL2.

2.2.1. Комбинированная терапия

Для анализа возможности усиления противоопухолевого эффекта RL2, проводили комбинированную терапию RL2-чувствительных опухолей с другими препаратами. На гепатокарциноме мыши ГА1, трансплантированной

внутрибрюшинно, оценивали терапевтический эффект комбинации RL2 и циклофосфамида. Средняя продолжительность жизни животных, получавших инъекции RL2, была достоверно выше, чем у животных контрольной группы, и составила 18 и 14 дней соответственно (Рис. 14А). Инъекции циклофосфамида увеличивали продолжительность жизни мышей-опухоленосителей до 26 дней, а наибольшая продолжительность жизни (в среднем 31 день) отмечена в группе животных, получавших комбинированную терапию циклофосфамидом и RL2.

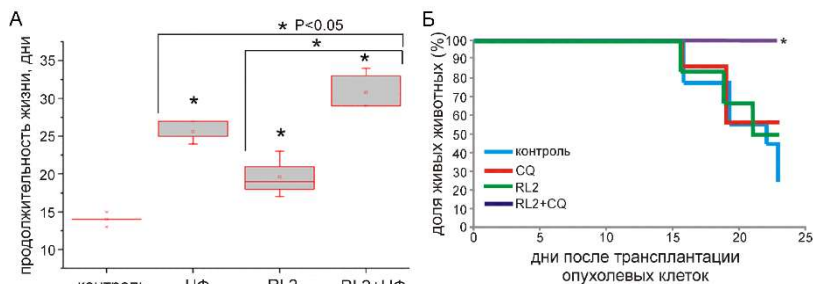


Рис. 14. Влияние RL2 на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей при использовании в комбинации с химиопрепаратами. (А) - Мышам А/J-носителям ГА1 (в/б) через 2 дня 5 раз вводили в/б RL2 (20 мг/кг), циклофосфамида (ЦФ, 30 мг/кг) или их комбинацию. Различия между группами и с контролем считали достоверными (*) при $p < 0.05$ (U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. (Б) Мышам-носителям лекарственно-устойчивой опухоли RLS вводили в/в RL2 (12 мг/кг) и/или в/б CQ (50 мг/кг), всего 4 и 8 инъекций, соответственно. Различия между контрольной и экспериментальными группами (*) считали достоверными ($p < 0.05$) (тест Пирсона Хи-квадрат).

Поскольку CQ усиливал цитотоксическое действие RL2 *in vitro* в синергетическом режиме, оценили терапевтический эффект комбинации RL2 и CQ *in vivo* на модели лимфосаркомы RLS с фенотипом лекарственной устойчивости. При анализе выживаемости жизни мышей-носителей опухоли RLS (Рис. 14Б) показано, что в группе животных, получавших комбинированную терапию CQ с RL2, выживаемость была наивысшей - живы были 100% животных, относительно контрольной группы (22%) и групп, получавших препараты CQ и RL2 в моно-режиме (57% и 50% соответственно). Это указывает на противоопухолевый потенциал комбинации RL2 и ингибитора аутофагии CQ и подтверждает синергический эффект, наблюдаемый *in vitro*.

2.2.2. Липосомальная форма RL2

Препараты, помещенные в липосомы, при системном введении преимущественно распределяются в печень из-за особенности метаболизма

липидов липосом. Поэтому наилучшей моделью для оценки эффективности липосомальной формы противоопухолевых препаратов можно считать опухоли, непосредственно возникающие в печени или метастатические узлы в печени. Препарат RL2 был помещен в липосомы на основе холестерина. Анализ активности липосомальной формы RL2 при однократном в/в введении проводили на модели гепатокарциномы ГА1, преимущественно метастазирующей в печень, и трансплантированной мышам A/Sn в/в. Анализ выживаемости мышей, получавших липосомальный RL2 показал увеличение средней продолжительности жизни до 48.4 ± 5.1 дней по сравнению с 32.8 ± 3.5 днями в контрольной группе (Рис. 15) и меньшее число метастатических узлов в печени. Таким образом, продемонстрирована антимагистатическая активность аналога RL2 в липосомальной форме.

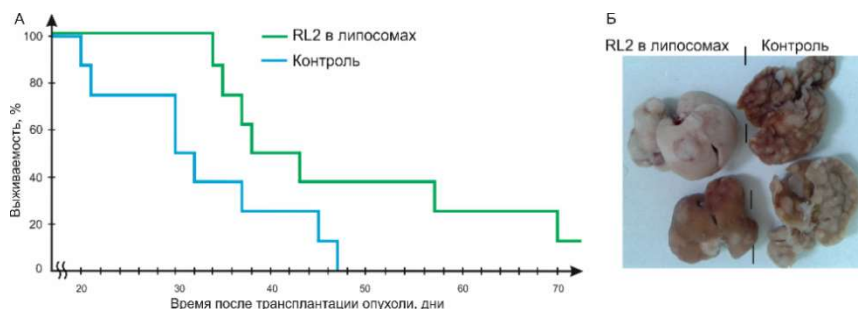


Рис. 15. Антимагистатическая активность липосомальной формы RL2. (А) Выживаемость мышей с в/в трансплантированными клетками ГА1, получавших 1х в/в инъекцию RL2 (20 мг/кг) в липосомах. Различия между группами статистически достоверны с $p \leq 0.05$. (Б) Характерный вид печени контрольных и экспериментальных животных.

2.3. Аналог лактапина EL1

Использование генетических конструкций, ведущих к продукции аналогов лактапина в эукариотических клетках, в которых реализуется процессинг и фолдинг трансгенного белка, может вести к увеличению его биологической активности. На основе лентивирусного вектора была создана плазмида pEL1, которая обеспечивала экспрессию секретируемой формы лактапина – EL1 в эукариотических клетках-продуцентах, при этом после отщепления сигнального пептида, кодируемый этой плазмидой аналог лактапина EL1 соответствовал аминокислотной последовательности белка RL2. Продукция белка EL1 в культуральную среду клеток HEK293, трансформированных плазмидой pEL1, была подтверждена методом Вестерн-блота, а количественное содержание EL1 в среде было определено методом ИФА. Анализ цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей аналог

лактапина EL1, проводили на опухолевых клетках человека различного гистологического происхождения (Рис. 16). Полученные данные свидетельствуют о выраженной цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей EL1, по отношению ко всем исследованным опухолевым клеточным линиям.

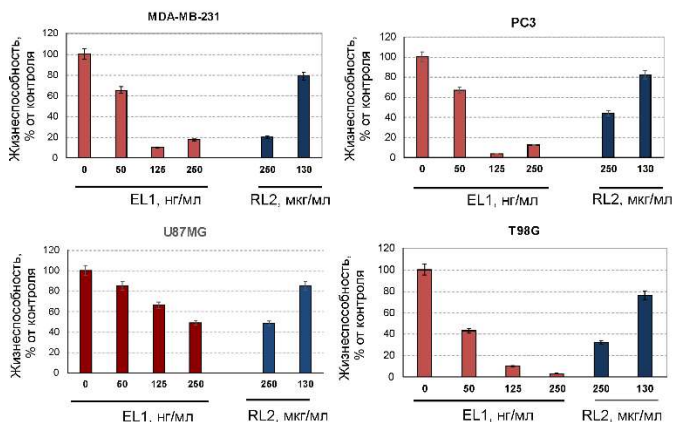


Рис. 16. Влияние рекомбинантного аналога лактапина EL1 на жизнеспособность опухолевых культур клеток человека. Клетки инкубировали с кондиционированной средой, содержащей EL1 в концентрации 50–250 нг/мл, в течение 48 ч. Данные представлены как относительное значение (%) $\pm$ SD по сравнению с контрольными клетками, обработанными культуральной средой клеток HEK293T, трансфицированных вектором pCDH. * - $p < 0.05$, отличия от контроля считали достоверными.

Таким образом, секретируемый аналог лактапина EL1 обладает высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток человека различного гистологического происхождения и может быть использован для создания более эффективных противоопухолевых препаратов.

2.4. CAR-NK-клетки, секретирующие аналог лактапина

Адоптивный перенос T- и NK-клеток, продуцирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), рассматривают как перспективную стратегию борьбы с онкологическими заболеваниями. Химерные антигенные рецепторы представляют собой искусственные молекулы, которые обеспечивают активацию несущих их клеток при контакте с определенным антигеном для индукции гибели клетки-мишени. Для повышения неспецифической цитотоксической активности NK клеток, была получена генно-модифицированная NK-клеточная линия человека YT – Cyto-CAR-YT-Lact, продуцирующая функциональный CAR против PSMA, несущая делецию гена,

кодирующего белок Shp-2, – негативный регулятор активации NK-клеток и каскасу, обеспечивающую секрецию EL1.

Цитотоксическую активность Cyto-CAR-YT-Lact-клеток *in vitro* оценивали на клеточной линии BrCCh4e-134 с гиперпродукцией PSMA и на изогенной PSMA-негативной родительской линии BrCCh4e. Клетки линии BrCCh4e-134 были резистентны к NK-клеткам линии YT дикого типа. Клетки модифицированной линии Cyto-CAR-YT-Lact эффективно уничтожали PSMA-позитивные опухолевые клетки-мишени и с меньшей эффективностью PSMA-негативные мишени в экспериментах *in vitro* (Рис. 17), что позволяет

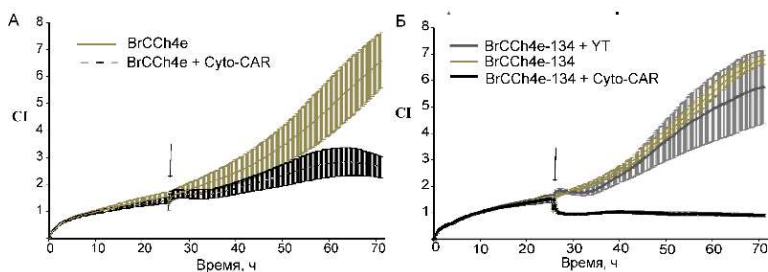


Рис. 17. Влияние Cyto-CAR-YT-Lact-клеток на жизнеспособность и пролиферацию опухолевых клеток-мишеней. Типичные кривые роста клеток рака молочной железы человека в режиме реального времени: (А) – клеточная линия BrCCh4e; (Б) – клеточная линия BrCCh4e-134; стрелкой отмечен момент добавления Cyto-CAR-YT-Lact-клеток (Cyto-CAR); контроль – NK-клетки линии YT дикого типа; CI – индекс пролиферации клеток (отн. ед.), данные представлены как среднее значение 3х независимых повторов $\pm$ SD.

предположить цитотоксический вклад секретируемого лактапина в эффекте Cyto-CAR-YT-Lact клеток в отношении PSMA-негативных мишеней.

Анализ антиметастатической активности Cyto-CAR-YT-Lact-клеток проводили на модели спонтанно метастазирующей и внутривенно трансплантированной PSMA-позитивной опухоли BrCCh4e-134 мышам SCID и NOD/SCID. Клетки линии BrCCh4e-134 трансплантировали мышам внутривенно, формировали рандомизированные группы и через 24 сут вводили внутривенно Cyto-CAR-YT-Lact-клетки животным экспериментальной группы. Через 14 сут после введения Cyto-CAR-YT-Lact-клеток были выявлены метастазы у 100% животных контрольной группы, преимущественно в лимфоузлах средостения, а также в печени и почках. В группе животных, получавших препарат клеток Cyto-CAR-YT-Lact, метастазов обнаружено не было (Рис. 18). Животным экспериментальной группы в модели спонтанного метастазирования с подкожно трансплантированными клетками BrCCh4e-134 внутривенно вводили 3×10^6 клеток Cyto-CAR-YT-Lact. При вскрытии животных через 14 сут после введения модифицированных CAR-NK-клеток было

выявлено, что терапия Cyto-CAR-YT-Lact-клетками не останавливала роста первичного опухолевого узла, но блокировала образование метастазов (Рис. 18).

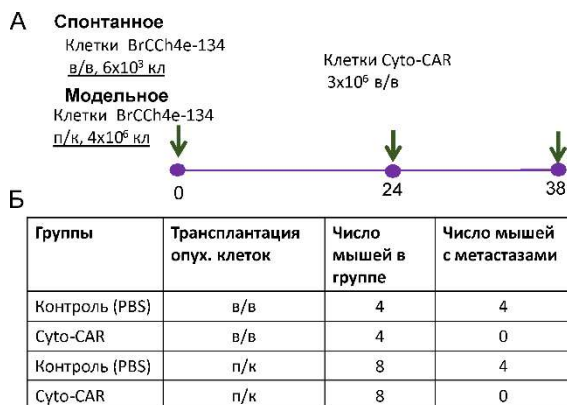


Рис. 18. CAR-опосредованная антиметастатическая активность модифицированных НК-клеток линии YT, секретирующих аналог лактапина. **(А)** Схема эксперимента с моделями спонтанного и модельного метастазирования. Животным вводили в/в Cyto-CAR-YT-Lact клетки как указано на схеме. **(Б)** Эффективность CAR-терапии.

Таким образом, продемонстрировано, что НК-клетки Cyto-CAR-YT-Lact обладают антиметастатической активностью.

2.5. Рекомбинантные вирусы осповакцины, несущие трансген лактапина

Онколитические вирусы способны инфицировать и лизировать клетки опухолей различного генеза, что позволяет разрабатывать новые подходы терапии онкологических заболеваний. Наряду с инактивацией определенных генов природных штаммов вирусов, направленной на селективное размножение вируса в опухолевых клетках, их дополнительное “усиление” различными трансгенными белками позволяет получать вирусы с улучшенным противоопухолевым действием. В ЛБТ ИХБФМ СО РАН совместно с сотрудниками ГЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, на основе штамма Lister были сконструированы рекомбинантные штаммы вируса осповакцины (VV), структуры которых представлены на Рис. 19. Один из них, VV-GMCSF-Lact, нес трансгены лактапина и гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) человека, другой, VV-GMCSF-dGF, – только трансген ГМ-КСФ с делецией гена ростового фактора вируса (VGF) в месте встройки гена лактапина. В качестве положительного контрольного штамма VV, использовали сконструированный по аналогичной схеме рекомбинант VV-GMCSF-Apo, несущий трансген апоптоз-

индуцирующего белка апоптоина. Продукция ГМ-КСФ, лактапина и апоптоина в инфицированных клетках была подтверждена методом вестерн-блота в культуральной среде и в клеточных лизатах. Онколитическую активность полученных рекомбинантных штаммов VV оценивали при инфицировании

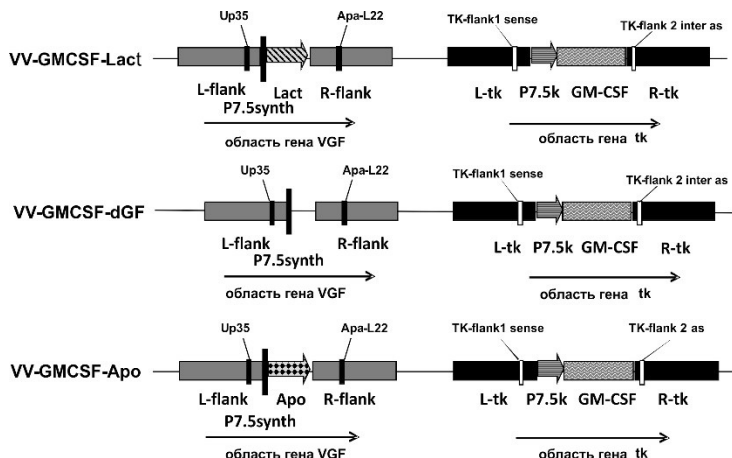


Рис. 19. Структура рекомбинантных штаммов VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Apo с указанием праймеров, использованных для анализа рекомбинантных вирусных ДНК.

опухолевых клеток человека различного гистогенеза. Было обнаружено, что рекомбинант VV-GMCSF-Lact проявлял большую цитотоксическую активность по отношению ко всем исследуемым линиям опухолевых клеток человека, чем

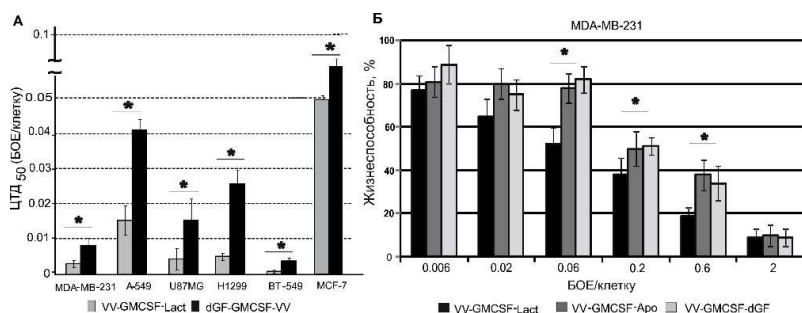


Рис. 20. Онколитическая активность VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Apo при инфицировании опухолевых клеток человека. (А) Данные ХТТ-теста для 72 ч инфекции. ЦТД₅₀-концентрация вируса, снижающая жизнеспособность клеток на 50%.

(Б) Данные МТТ-теста на клетках MDA-MB-231 для 72 ч инфекции. (*) – различия между группами достоверны, $p < 0.05$.

рекомбинант VV-GMCSF-dGF, не продуцирующий аналога лактапина (Рис. 20А). Таким образом, продукция аналога лактапина ведет к усилению цитотоксической активности рекомбинантного вируса VV-GMCSF-Lact.

Сравнение активностей вирусов, продуцирующих лактапин и апоптин, проводили на высокочувствительной линии клеток MDA-MB-231 (Рис. 20Б). Согласно полученным данным в диапазоне доз 0.06–0.6 БОЕ/клетку онколитический эффект VV-GMCSF-Lact был достоверно выше, чем VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Apo. Анализ чувствительности персональных культур клеток ЗОМЖ, опухолевых в мышах SCID, к действию VV-GMCSF-Lact показал, что наибольшую чувствительность к вирусу проявляла линия клеток BrCCh4e (Рис. 21).

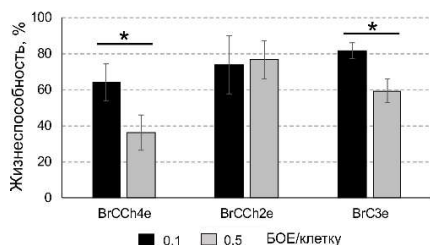


Рис. 21. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact при инфицировании персональных культур клеток ЗОМЖ человека. Для инфицирования использовали дозы вируса 0.1 и 0.5 БОЕ/клетку. Данные МТТ-теста для 72 ч инфекции. (*) – различия между группами достоверны, $p < 0.05$.

Известно, что основным типом клеточной гибели при инфицировании вирусами осповакцины является программируемый некроз. Поэтому, важно было проанализировать, как влияет экспрессия лактапина на гибель клеток при инфекции вирусом VV-GMCSF-Lact в сравнении со штаммами VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Apo. Рекомбинантные онколитические вирусы относят к препаратам иммунотерапии, и для оценки их специфического противоопухолевого действия необходимо рассматривать не только модели опухолей человека на иммунодефицитных животных, но и опухолевые модели на сингенных животных. Поэтому исследование различий в индукции клеточной гибели между исследуемыми штаммами проводили на линиях MX7 и MDA-MB-231 методом проточной цитометрии с окрашиванием Аннексином V-FITC и йодидом пропидия (PI) и с анализом соответствующих долей клеток с активированными каспазами -3 и -7. Сравнение долей клеток в раннем и позднем апоптозе при заражении рекомбинантными VV показал, что клетки MX-7 были менее чувствительны к онколитическому действию вирусов (Рис 22А, Б). Популяция Аннексин V+ клеток была наибольшей при инфицировании штаммом VV-GMCSF-Lact после 36 ч инфекции как для низкой дозы инфицирования (0.05 БОЕ/клетку), так и для высокой дозы (0.5 БОЕ/клетку) для

обеих исследуемых клеточных линий. Анализ активированных каспаз-3 и -7 в клетках, инфицированных рекомбинантными штаммами вирусов, показал достоверное увеличение доли клеток с активированными каспазами для штамма VV-GMCSF-Lact, начиная с 24 ч инфекции, что хорошо согласуется с данными по анализу апоптотической популяции клеток (Рис. 22В).

Суммируя данные по апоптозу и активированным каспазам можно заключить, что рекомбинанты VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo, продуцирующие апоптоз-стимулирующие белки лактаптин и апоптин, обладают большим потенциалом в индукции апоптоза в опухолевых клетках, что определяет их высокую цитотоксическую активность.

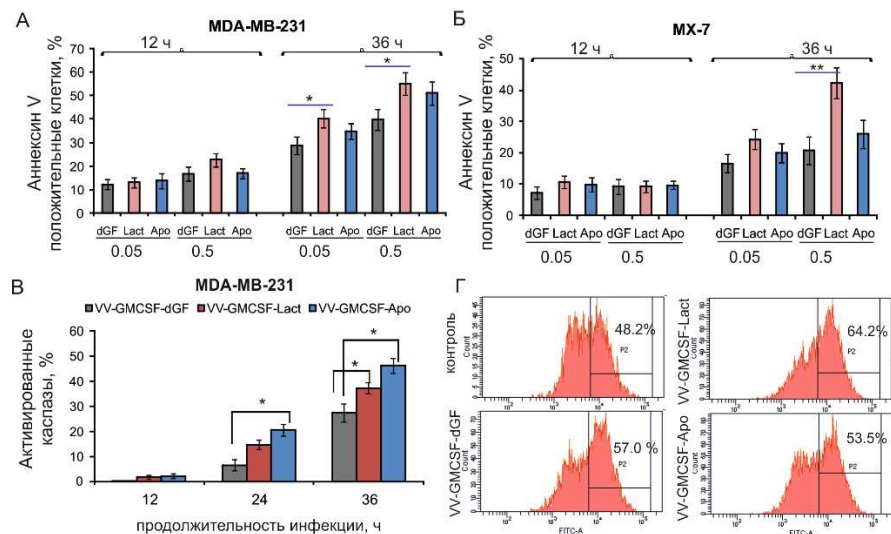


Рис 22. Анализ апоптоза в клетках MDA-MB-231 и MX-7 при инфицировании и штаммами VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-Apo и VV-GMCSF-dGF. Клетки инфицировали VV в дозе 0.05 и 0.5 БОЕ/клетку (**А, Б**) и 0.05 БОЕ/клетку (**В**). (**А, Б**) После 12 или 36 ч инфекции клетки были окрашены в системе Аннексин V/PI и проанализированы методом проточной цитометрии для определения популяции Аннексин V+ клеток. (**В**) Анализ доли клеток с активированными каспазами -3 и -7 через 12, 24 и 36 ч инфекции в клетках MDA-MB-231 методом проточной цитометрии. Данные представлены как среднее $\pm$ SD, $n=3$ независимых эксперимента. (*) Различия между группами были статистически значимыми при $p < 0.05$. (**Г**) Репрезентативный пример анализа изменения МПМ в клетках MDA-MB-231 методом проточной цитометрии через 36 ч инфекции. Окраска клеток JC1.

Изменение мембранного потенциала митохондрий (МПМ) также является маркером развития апоптоза. Для анализа МПМ в клетках, инфицированных рекомбинантными VV, использовали липофильный катионный флуорохром JC1. Сдвиг эмиссии флуоресценции детектировали методом проточной цитометрии, суть которого состоит в том, что агрегаты JC1 накапливаются в функциональных митохондриях и флуоресцируют в оранжевой области ($\lambda=590$ нм), тогда как при снижении МПМ JC1 остается в виде мономера и флуоресцирует в зеленой области ($\lambda=525$ нм). Через 24 ч инфекции рекомбинантными вирусами, наблюдали увеличение интенсивности зеленого флуоресцентного сигнала относительно контрольных образцов, у всех образцов клеток, которое было максимальным в случае инфицирования VV-GMCSF-Lact (Рис. 22Г). Динамика изменения количества BAX в клетках MDA-MB-231 на протяжении инфекции была оценена методом вестерн блота. Было обнаружено, что инфицирование рекомбинантными вирусами VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-Apo и VV-GMCSF-dGF позитивно регулирует BAX, что характерно для митохондриального пути апоптоза. Таким образом, инсерция трансгенов апоптоз-индуцирующих белков лактапина и апоптина усиливает онколитический потенциал рекомбинантных VV, стимулируя митохондриальный апоптоз в инфицированных опухолевых клетках.

2.5.1. Противоопухолевое действие рекомбинантных VV

Для оценки онколитической активности рекомбинантных штаммов осповакцины *in vivo* использовали 2 опухолевые модели — лекарственно-устойчивую лимфосаркому мышей RLS и ксенографты аденокарциномы человека MDA-MB-231. Противоопухолевую эффективность оценивали по

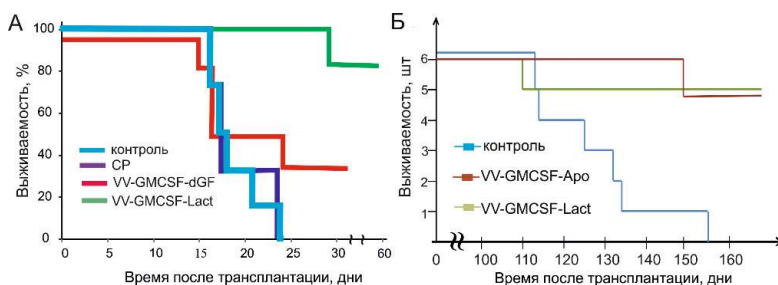


Рис. 23. Влияние терапии рекомбинантными вирусами осповакцины на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей. Выживаемость мышей-носителей опухоли RLS (А) при однократном в/о введении препарата вирусов (1×10^7 БОЕ) VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Lact, группы из 8 животных. Препарат сравнения циклофосфамид (CP) вводили в/в (60 мг/кг). (Б) Выживаемость мышей-носителей п/к

трансплантированной опухоли MDA-MB-231 при двукратном в/о введении препарата вирусов (1×10^7 БОЕ) VV-GMCSF-Apo и VV-GMCSF-Lact.

торможению роста опухоли и по увеличению продолжительности жизни у животных, получавших инъекции вирусов по сравнению с контрольными животными (Рис. 23). В качестве препарата сравнения для лечения вирусами VV-GMCSF-dGF и VV-GMCSF-Lact лимфосаркомы RLS использовали химиопрепарат циклофосфамид (60 мг/кг). Сравнение динамики роста опухоли RLS при внутриопухолевом введении препаратов вирусов и циклофосфамида внутривенно показало, что однократное введение вируса VV-GMCSF-Lact (1×10^7 БОЕ/животное) подавляло рост опухоли на 93%, а VV-GMCSF-dGF – на 36%, при этом средний размер опухолей в группе, получавшей циклофосфамид, не отличался от такового у животных в контрольной группе, которая получала инъекцию физиологического раствора (Табл. 6). Данные по выживаемости в экспериментальных и контрольной группах коррелировали с данными по размеру опухолей, и к 60-му дню эксперимента в группе VV-GMCSF-Lact были живы 80% животных, в группе VV-GMCSF-dGF – 25% животных, а в группах “контроль” и “циклофосфамид” все животных скончались уже к 24-му дню эксперимента (Рис. 23). Таким образом, однократное внутриопухолевое введение VV-GMCSF-Lact было высокоэффективно в отношении опухоли с фенотипом лекарственной устойчивости.

Таблица 6. Терапевтическая эффективность рекомбинантных VV в зависимости от типа введения

Рекомбинантный вирус	Число инъекций	Тип введения	$TPO = (\Delta V_{\text{контр}} - \Delta V_{\text{лечение}}) \times 100 / (\Delta V_{\text{контр}}), \%$
MDA-MB-231			
VV-GMCSF-dGF	2	в/в	42
		в/о	н/о
VV-GMCSF Lact	2	в/в	81
		в/о	94
VV-GMCSF Apo	2	в/о	85
RLS			
VV-GMCSF dGF	1	в/о	36
	2	в/в	н/о
VV-GMCSF Lact	1	в/о	93
	2	в/в	70

Примечание: животным-опухоленосителям вводили рекомбинантный штамм VV в дозе 1×10^7 /мышь. TPO, торможение роста опухоли, ΔV - изменение объема опухоли, н/о – не определяли.

Сравнение противоопухолевой активности рекомбинантов VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo в отношении аденокарциномы молочной железы при в/о введении не выявило достоверных отличий в эффективности этих штаммов вируса; торможение роста опухоли составило 94 и 85 % для VV-GMCSF-Lact и

VV-GMCSF-Аро соответственно (Табл. 6). Различий в продолжительности жизни животных, получавших VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Аро, также не было выявлено (Рис. 23Б).

Поскольку не все опухоли доступны для внутриопухолевых (в/о) инъекций препаратов вирусов, было проведено сравнение эффективности в/в и в/о способов введения вирусов. Обнаружено, что несмотря на то, что ТРО при в/о способе введения VV-GMCSF-Lact было достоверно выше, чем при в/в введении (Табл. 6), препарат VV-GMCSF-Lact, введенный внутривенно, проявлял высокую противоопухолевую активность.

3. Противоопухолевые подходы на основе холодной плазмы

По сравнению с химиотерапией, электрофизические методы воздействия на опухоли имеют свои преимущества. Одним из таких подходов может стать применение холодной плазменной струи (ХПС), которая представляет собой последовательность стримеров, генерируемых в инертных газах в диэлектрическом канале плазменного устройства и распространяющихся по струе газа в окружающем воздухе при атмосферном давлении. В плазменно-стимулированных химических реакциях образуются различные активные кислородсодержащие и азотсодержащие соединения, такие как H_2O_2 , HNO_2 , HNO_3 , N_2O , NO_2 , NO , N_2O_3 и радикалы, которые являются основными триггерными молекулами гибели клеток при воздействии ХПС. Воздействие на биологические объекты может быть прямым, когда непосредственно происходит облучение клеток, либо опосредованным, когда к клеткам добавляют среду, предварительно облученную ХПС.

Опосредованное влияние ХПС на выживаемость опухолевых клеток человека изучали на клеточных моделях эпидермоидной карциномы кожи человека A431 и клетках эмбриональной почки человека HEK293. На Рис. 24А представлена установка с газоразрядным устройством, генерирующим плазменную струю. К клеткам добавляли свежее облученную культуральную среду и анализировали жизнеспособность в режиме реального времени (Рис. 24Б). Показано, что цитотоксический эффект зависит от продолжительности облучения среды. Выявлены условия облучения, при которых клетки HEK293 проявляли резистентность к среде, облученной ХПС, а жизнеспособность раковых клеток A431 достоверно снижалась, – облучение в течение 2 мин, напряжение 3.6 кВ, скорость аргона 4 л/мин.

Поскольку именно радикалы, генерируемые ХПС, и продукты их реакций с компонентами среды, являются основными индукторами клеточной гибели, параметры холодной струи можно изменять для достижения различного уровня генерации радикалов и усиления специфических эффектов. Компьютерное моделирование плазмохимических процессов показало, что введение в систему дополнительного заземленного электрода (ЗЭ), т.н. “подложки”, должно

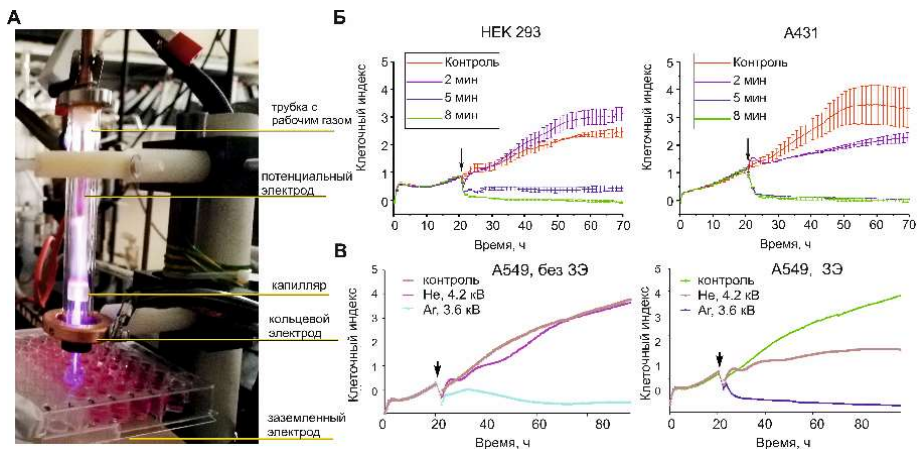


Рис. 24. Облучение на газоразрядной установке. (А) – формирование ХПС в газоразрядной установке. Результаты опосредованного воздействия ХПС (Б) и прямого с применением ЗЭ (В) в гелии на клетки представлены как кривые пролиферации клеток в режиме реального времени. Стрелкой указан момент добавления облученной среды (Б) или облучения клеток (В).

повышать генерацию ОН радикалов над поверхностью жидкости вблизи биоматериала за счет изменения распределения электрического поля над биологическим объектом. При введении в систему заземленной подложки были сняты спектры газовой фазы ХПС вблизи контакта плазмы с культуральной жидкостью при $\lambda=309$ нм. Изменения интенсивности пика, соответствующего радикалу ОН, были проанализированы при различном напряжении (2.5 кВ – 6.5 кВ) и разных скоростях потока газа при использовании заземленного электрода или без него. Оказалось, что действительно, введение дополнительного ЗЭ в систему ведет к увеличению интенсивности пика, соответствующего радикалу ОН. Установлено, что интенсивность генерации ОН-радикалов начинала возрастать при напряжении $U > 4$ кВ. В свою очередь, интенсивность линий в спектре, соответствующем ОН-радикалам, при $U=4.8$ кВ возрастала на несколько порядков при использовании ЗЭ, что свидетельствует об увеличении их продукции в этих условиях. Результаты сравнения эффективностей прямого облучения клеток ХПС при разных режимах представлен для клеток аденокарциномы легкого человека A549 (Рис. 24В). Можно видеть, что введение в систему ЗЭ усиливало цитотоксический эффект как для струи в гелии, так и для струи в аргоне (Рис. 24В). Такие эффекты применения ЗЭ продемонстрированы впервые. Также можно отметить, что холодная струя, генерируемая в аргоне с меньшим напряжением, вызывала больший цитотоксический эффект, чем струя в гелии с большим напряжением. Таким

образом, частично оптимизированы условия опосредованной и прямой обработки опухолевых клеток ХПС.

Для определения активации маркеров иммуногенной клеточной гибели в клетках при облучении ХПС, анализировали изменение HMGB1 в культуральной среде и транслокацию CRT и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану. Показано, что облучение ХПС индуцирует повышение содержания HMGB1 в культуральной среде в среднем в четыре раза, доли CRT-положительных клеток до 26%, а доли HSP70-положительных клеток до 41% (Рис. 25 А,Б) Таким образом, облученные ХПС клетки испускают молекулярные сигналы для клеток иммунной системы.

Поскольку в опухолевых клетках, облученных ХПС, наблюдали активацию маркеров иммуногенной клеточной гибели (Рис. 25 А,Б), ХПС могла бы активировать эти маркеры и при облучении опухоли *in vivo*. Для проверки предположения анализировали уровень HMGB1 в сыворотке крови мышей-опухоленосителей после их облучения ХПС. Здоровых мышей СЗН/Не и мышей-носителей подкожно трансплантированной рабдомиосаркомы МХ-7 дважды облучали ХПС в гелии с перерывом в 24 ч. Через 1 ч и 24 ч после 2-го облучения, анализировали содержание HMGB1 в сыворотке крови животных (Рис. 25В). Можно видеть, что через 1 ч после 2-го облучения концентрация HMGB1 в сыворотке оказывается увеличенной в 2 раза только у животных-опухоленосителей, и снижается до контрольного уровня через 24 ч после облучения.



Рис. 25. Индукция маркеров иммуногенной клеточной гибели в опухолевых клетках и крови животных после облучения ХПС. (А) HMGB1 в образцах культуральной среды облученных клеток (Б) Изменение поверхностного CRT и HSP70 в клетках МХ-7 по данным проточной цитометрии; (В) HMGB1 в крови животных (по данным ИФА).

Таким образом, наиболее вероятно, что локальное высвобождение HMGB1 из гибнущих опухолевых клеток ведет к системному увеличению HMGB1 в крови животных. Белок HMGB1 связывается с рецепторами TLR4 и необходим для оптимального TLR4-зависимого процессинга и презентации Т-клеткам антигенов от гибнущих опухолевых клеток дендритными клетками. Таким образом, холодная плазма индуцирует гибель опухолевых клеток и активирует

in vivo некоторые молекулярные изменения, стимулирующие противоопухолевый иммунный ответ.

Заключение

Разработка новых противоопухолевых препаратов и подходов определяет необходимость их тестирования как на начальных стадиях исследования, так и на стадии доклинических испытаний на релевантных клеточных и опухолевых моделях, с созданием которых связано настоящее исследование. Созданные новые клеточные линии рака молочной железы и эндометрия человека, со стабильными культуральными и морфологическими характеристиками, различающимися по паттерну продуцируемых поверхностных и внутриклеточных молекулярных маркеров, расширили арсенал моделей для исследователей, работающих в близких к молекулярной онкологии областях. Депонирование новых клеточных культур в Российской коллекции культур клеток позвоночных делает их доступными для широкой аудитории исследователей. Исследование новых способов индукции мезенхимально-эпителиального перехода является существенным для понимания фундаментальных аспектов метастазирования. Знание механизмов запуска разных форм клеточной гибели под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2, является важным для понимания молекулярно-биологических основ, обуславливающих предпочтительный тип клеточной гибели. Результатом исследования этих механизмов стала выработка новых стратегий усиления противоопухолевой активности RL2, выявление эффективных препаратов-партнеров для комбинированной терапии, а также успешная разработка новых продуктов – рекомбинантных вирусов осповакцины и модифицированных NK-клеток, продуцирующих аналоги лактапина. Данная работа послужила базисом для проведения доклинического исследования рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact как противоопухолевого средства. Исследования применения холодной плазменной струи в отношении клеточных и опухолевых моделей с введением в систему дополнительного заземленного электрода, ставшие первыми исследованиями подобного рода в Российской Федерации, заложили базис для более глубоких изысканий в этом направлении.

Резюмируя, можно заключить, что результаты, полученные в настоящей работе, существенно расширяют подходы противоопухолевой терапии онкологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой систематическое исследование, в результате которого установлены функциональные аспекты молекулярного механизма

гибели опухолевых клеток под действием рекомбинантного аналога лактаптина RL2 и показан противоопухолевый потенциал препаратов, содержащих аналоги лактаптина, в том числе рекомбинантных вирусов осповакцины и CAR-NK-клеток. В качестве потенциального противоопухолевого подхода исследована возможность применения холодной плазменной струи для подавления роста опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*. Разработаны новые клеточные и опухолевые модели, позволяющие тестировать цитотоксическую, противоопухолевую и антиметастатическую активность препаратов.

1. Показано, что полученные культуры клеток эндометрия и молочной железы человека являются релевантными моделями для исследования особенностей чувствительности опухолей к действию противоопухолевых агентов, иммуномодуляторов и канцерогенов.

- С помощью разработанного метода “импульсной гипоксии”, индуцирующей мезенхимально-эпителиальный переход в клетках с мезенхимальным фенотипом, созданы модели метастазирования *in vitro*.
- На основе полученной линии рака молочной железы человека создана клеточная линия BrCCh4e-134, продуцирующая простат-специфический мембранный антиген, для анализа таргетных противоопухолевых и антиметастатических препаратов.
- Показано, что культуры на основе клеток эндометрия сохраняют экспрессию генов, кодирующих рецепторы эстрогена и прогестерона, наблюдаемую в опухоли, и являются подходящими моделями для исследования препаратов гормональной терапии опухолей эндометрия и оценки влияния канцерогенов, взаимодействующих с рецепторами эстрогенов.

2. Обнаружено, что основным среди клеточных белков-партнеров аналога лактаптина RL2, выявляемых протеомными методами, является TOM70, чье взаимодействие с RL2 нарушает импорт митохондриальных белков и приводит к снижению митохондриального потенциала, что индуцирует митофагию и вызывает несогласованную регуляцию генов каскада NF- κ B, стимулируя иммуногенную клеточную гибель. Показано, что гибнущие клетки, трансплантированные мышам, способны стимулировать противоопухолевый иммунный ответ.

3. Показана противоопухолевая эффективность потенциальных препаратов на основе аналога лактаптина RL2.

- Установлено, что рекомбинантный аналог лактаптина RL2 в липосомальной форме эффективно подавляет формирование метастазов, а комбинированная терапия RL2 с циклофосфамидом или хлорохином достоверно увеличивает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

- Выявлена терапевтическая эффективность НК-клеток человека с делецией гена Shp-2, продуцирующих функциональный химерный антигенный рецептор простат-специфического мембранного антигена и аналог лактапина EL1.
- В клетках, инфицированных рекомбинантным вирусом осповакцины, несущим трансгены лактапина и гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора, продемонстрировано усиление цитотоксического действия вируса и активации каспаз-3 и -7 и стимулирование митохондриального пути апоптоза по сравнению с клетками, инфицированными вирусом без трансгена лактапина. Показана высокая противоопухолевая эффективность данного вируса в отношении солидных опухолей человека и мыши.
- 4. Разработан новый противоопухолевый подход, основанный на облучении биологических мишеней холодной плазменной струей, цитотоксический эффект которого зависит от условий облучения. Показано, что в облученных клетках активируются маркеры иммуногенной клеточной гибели.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

Статьи в научных журналах:

1. Wohlfromm F., Richter M., Otrin L., Seyrek K., Vidakovic-Koch T., Kuligina E., Richter V., **Koval O.**, Lavrik I. Interplay between mitophagy and apoptosis defines a cell fate upon co-treatment of breast cancer cells with a recombinant fragment of human κ -Casein and TRAIL // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.617762>.
2. Troitskaya O., Varlamov M., Nushtaeva A., Richter V., **Koval O.** Recombinant lactaptin induces immunogenic cell death and creates an antitumor vaccination effect in vivo with enhancement by an IDO inhibitor // *Molecules.* – 2020.- V.25. – P. 2804-2821. DOI: 10.3390/molecules25122804.
3. Richter M, Wohlfromm F, Kähne T, Bongartz H, Seyrek K, Kit Y, Chinak O, Richter VA, **Koval OA**, Lavrik IN. The recombinant fragment of human κ -Casein induces cell death by targeting the proteins of mitochondrial import in breast cancer cells // *Cancers (Basel).* – 2020. – V. 12. – P.1427-1448. doi:10.3390/cancers12061427.
4. Troitskaya O., Golubitskaya E., Biryukov M., Varlamov M., Gugin P., Milakhina E., Richter V., Schweigert I., Zakrevsky D., **Koval O.** Non-thermal plasma application in tumor-bearing mice induces increase of serum HMGB1 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 5128-5142. doi.org/10.3390/ijms21145128.
5. Schweigert I., Alexandrov A., Zakrevsky D., Gugin P., Milakhina E., Golubitskaya E., Troitskaya O., Biryukov M., **Koval O.** Analysis of grounded substrate effects on cold atmospheric plasma jet irradiation of cellular and animal

- models // J. Phys.: Conf. Ser. – 2020. – V. 1698. – P. 012010-012016. doi:10.1088/1742-6596/1698/1/012010.
6. Субракова В.Г., Кулемзин С.В., Беловежец Т.Н., Чикаев А.Н., Чикаев Н.А., **Коваль О.А.**, Горчаков А.А., Таранин А.В. Нокаут гена *shp-2* приводит к повышению CAR-опосредованной цитотоксичности НК-клеток линии YT // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – №1. – С. 80-86.
 7. Schweigert I, Zakrevsky D, Gugin P, Yelak E, Golubitskaya E, Troitskaya O, **Koval O**. Interaction of cold atmospheric argon and helium plasma jets with bio-target with grounded substrate beneath // Appl. Sci. – 2019. – V. 9. – P. 4528-4549. <https://doi.org/10.3390/app9214528>.
 8. Zakrevsky D., Yelak E., Gugin P., Golubitskaya E.A., Troitskaya O.S., **Koval O.A.**, Vagapov S., Schweigert I. Interaction of cold atmospheric plasma jet with bio targets: different sensitivities of human cell lines // J. Phys.: Conf. Ser. – 2019. – V. 1393. – P. 012153-012158. doi:10.1088/1742-6596/1393/1/012153.
 9. Bagamanshina A, Troitskaya O., Nushtaeva A., Yunusova A., Starykovych M., Kuligina E., Kit Yu., Richter M., Wohlfromm F., Kähne T., Lavrik I., Richter V., **Koval O**. Cytotoxic and Antitumor Activity of Lactaptin in Combination with Autophagy Inducers and Inhibitors // BioMed Res. Int. – 2019. – V. 2019. – P. 1-16. doi: 10.1155/2019/4087160.
 10. Nushtaeva A, Karpushina A, Ermakov M, Gulyaeva L, Gerasimov A, Sidorov S, Gayner T, Yunusova A, Tkachenko A, Richter V, **Koval O**. Establishment of primary human breast cancer cell lines using “pulsed hypoxia” method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice // Cancer Cell Int. – 2019. – V. 19. – P. 46 (1-19). – doi:10.1186/s12935-019-0766-5.
 11. Chanyshiev MD, **Koval OA**, Nushtaeva AA, Gulyaeva LF. Effect of benzo[a]pyrene on the expression of miR-126, miR-190a and their target genes EGFL7, TP53INP1 and PHLPP1 in primary endometrial cells // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2019 – V 33. – N. 6. – P. 1-6. e22314. DOI: 10.1002/jbt.22314.
 12. Голубицкая Е., Троицкая О., Елак Е., Гугин П., Рихтер В., Швейгерт И., Закревский Д., **Коваль О**. Воздействие холодной плазменной струи снижает жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого // Acta Naturae. – 2019. – Т. 11. – № 3 (42). – С. 16-19. DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-16-19.
 13. **Коваль О.А.**, Субракова В.Г., Нуштаева А.А., Беловежец Т.Н., Троицкая О.А., Ермаков М.С., Варламов М.Е., Чикаев А.Н., Кулигина Е.В., Кулемзин С.В., Горчаков А.А., Таранин А.В., Рихтер В.А. CAR-опосредованная антиметастатическая активность модифицированных НК-клеток линии YT // Гены & Клетки. –, 2019. – Т. 14, – №4. – С. 66-71. DOI: 10.23868/201912034.
 14. Nushtaeva A.A., Stepanov G.A., Semenov D.V., Zhuravlev E.S., Balahonova E.A., Gerasimov A.V., Sidorov S.V., Savelyev E.I., Kuligina E.V., Richter V.A., **Koval O.A**. Characterization of primary normal and malignant breast

- cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents // BMC Cancer. – 2018., V18, P. 728-739. doi: 10.1186/s12885-018-4635-8.
15. Ткаченко А.В., Троицкая О.С., Семенов Д.В., Дмитриенко Е.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., **Коваль О.А.** Активация иммунной системы рекомбинантным аналогом противоопухолевого белка лактаптоина // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51. – №. 5. – С. 787-796.
16. **Koval O.**, Kochneva G., Tkachenko A., Troitskaya O., Sivolobova G., Grazhdantseva A., Nushtaeva A., Kuligina E., Richter V. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells // BioMed Res. Int. – 2017. – V. 2017. – P. 1-14. <https://doi.org/10.1155/2017/3620510>.
17. Кочнева Г.В., Ткачёва 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 секретируемый химерный белок, состоящий из ГМ-КСФ человека и онкотоксического белка лактаптоина // Биофармацевтический журнал. – 2017. – Т. 9, – №. 11, – С. 11-21.
18. Каледин В.И., **Коваль О.А.**, Кулигина Е.В., Лушникова Е.Л., Николин В.П., Попова Н.А., Пышная И.А., Рихтер В.А. Противометастатический эффект липосомальной формы рекомбинантного лактаптоина // Бюл. экспер. биол. мед. – 2017. – Т. 164, – № 12. – С. 734 – 738.
19. **Коваль О.А.**, Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., Ткаченко А.В., Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Сравнительный анализ активности лактаптоина, полученного в про- и эукариотических системах экспрессии // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – №7. – С. 764-769.
20. Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A., Grazhdantseva A., Troitskaya O., Nushtaeva A., Tkachenko A., Kuligina E., Richter V., **Koval O.** Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy.// Oncotarget – 2016. – V. 7. – P. 74171-74188. DOI:10.18632/oncotarget.12367.
21. **Koval O.**, Sakaeva G., Fomin A., Nushtaeva A., Semenov D., Kuligina E., Gulyaeva L., Gerasimov A., Richter V. Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumour samples to new potential anticancer peptide lactaptin // J. of Cancer Res. Ther. – 2015. – V. 2. – P.345-351. doi: 10.4103/0973-1482.157301.

Патенты:

22. **Коваль О.А.**, Нуштаева А.А., Троицкая О.С., Горчаков А.А., Варламов М.Е., Субракова В.Г., Беловежец Т.Н., Кулемзин С.В., Кулигина Е.В., Таранин А.В., Рихтер В.А. Рекомбинантная клеточная линия рака молочной железы человека BrCCh4e-134, экспрессирующая простат-специфический

- мембранный антиген человека // Патент РФ № 2726541. приоритет от 19.11.2019.
23. Нуштаева А.А., **Коваль О.А.**, Троицкая О.С., Ермаков М.С., Кулемзин С.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А. Клеточная линия рака молочной железы человека BrCCh4c // Патент РФ № 2717654. приоритет от 05.08.2019.
24. **Коваль О.А.**, Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., Ткаченко А.В., Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Рекомбинантный пептид EL1, обладающий цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам человека // Патент РФ № 2683221. приоритет от 01.12.2017.
25. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Ткачёва А.В., Кулигина Е.В., **Коваль О.А.**, Рихтер В.А. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-S-Lact вируса осповакцины, обладающий онколитической активностью и продуцирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека и секретируемую форму онкотоксического белка лактапина // Патент РФ № 2621861. приоритет от 30.05.2016.
26. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Ткачёва А.В., Кулигина Е.В., **Коваль О.А.**, Рихтер В.А. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF/lact-dGF вируса осповакцины, обладающий онколитической активностью и продуцирующий секретируемый химерный белок, состоящий из гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и онкотоксического белка лактапина // Патент РФ № 2630672. приоритет от 04.10.2016.
27. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Ткачёва А.В., Кулигина Е.В., **Коваль О.А.**, Рихтер В.А. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, обладающий онколитической активностью и продуцирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека и онкотоксический белок лактапин // Патент РФ № 2604187. приоритет от 20.10.2015.

Подписано в печать. Печать офсетная.

Бумага офсетная. Формат 60х84 1/16. Усл. печ. 2 л.

Тираж X экз. Заказ № X

Отпечатано в типографии «Срочная полиграфия»

ИП Малыгин Алексей Михайлович

630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 6/1, оф. 104