

МЕХАНИЗМЫ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АПОПТИН- ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ШТАММА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

Зонов Евгений Владимирович

Клеточная биология, цитология, гистология – 03.03.04

Научный руководитель:
проф., д.б.н. Рябчикова Е.И.

Современные методы лечения опухолевых заболеваний – иммунотерапия, применение наночастиц и виротерапия – направлены на повышение селективности воздействия и нивелирование побочных эффектов.

Вирусы, способные избирательно уничтожать опухолевые клетки – онколитические вирусы (ОВ).

Модификация вирусного генома с целью введения определенных трансгенов – способ получения ОВ с требуемыми свойствами.

Проапоптотические белки – перспективные трансгены – гибель опухолевых клеток путем апоптоза.

Апоптин – неструктурный белок вируса анемии цыплят. Индуцирует апоптоз исключительно в опухолевых клетках.

Вирус осповакцины (ВОВ) не интегрирует свой геном в геном хозяина, а в геном ВОВ можно встроить до 20 тыс. пар нуклеотидов. ВОВ имеет долгую историю применения.

Рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 был создан в ГНЦ ВБ «Вектор» на основе штамма Л-ИБП ВОВ.

Штамм VVdGF-ApoS24/2 обладает повышенной литической активностью в отношении опухолевых клеток *in vitro*.

Цель работы: изучение механизмов противоопухолевого действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB на ксенографты карциномы A431 человека и мышиную карциному Эрлиха.

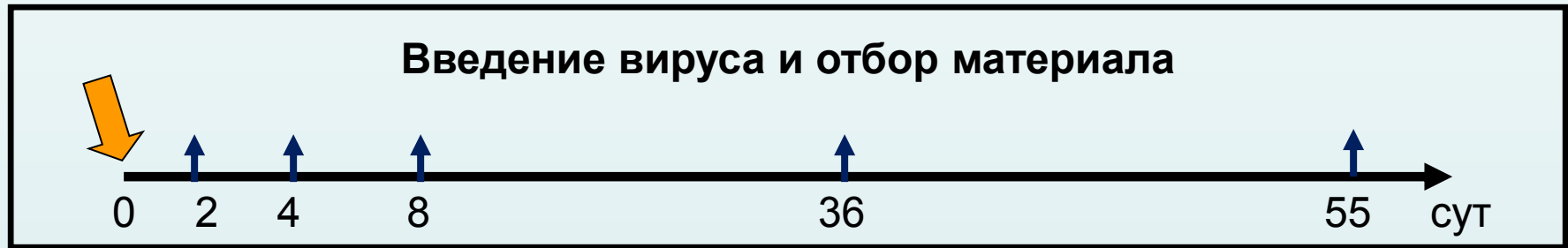
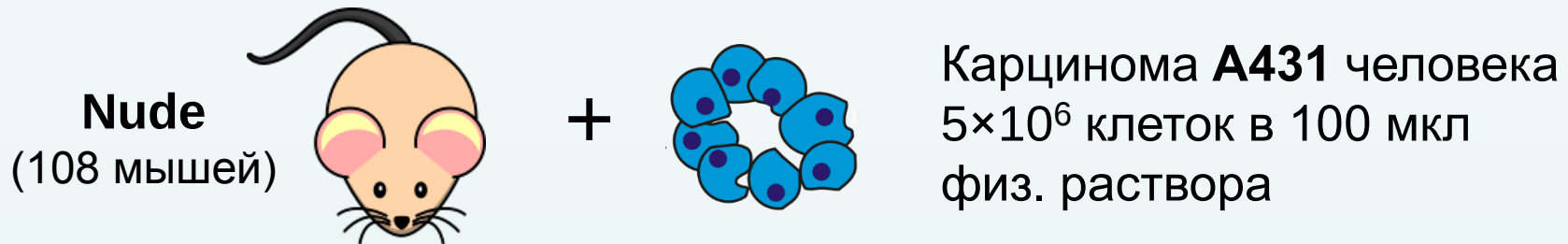
ЗАДАЧИ

- 1. Изучить морфологические характеристики репликации штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИБП BOB в опухолевых клетках ксенографтов карциномы A431 человека и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей.**
- 2. Оценить морфологическими методами противоопухолевое действие штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB в сравнении с исходным штаммом Л-ИБП. Установить механизмы противоопухолевого действия штаммов на ксенографты карциномы A431 человека и трансплантаты карциномы Эрлиха мышей.**
- 3. Изучить влияние штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИБП BOB на процессы пролиферации и апоптоза клеток ксенографтов карциномы человека A431 и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей.**

Положения, выносимые на защиту:

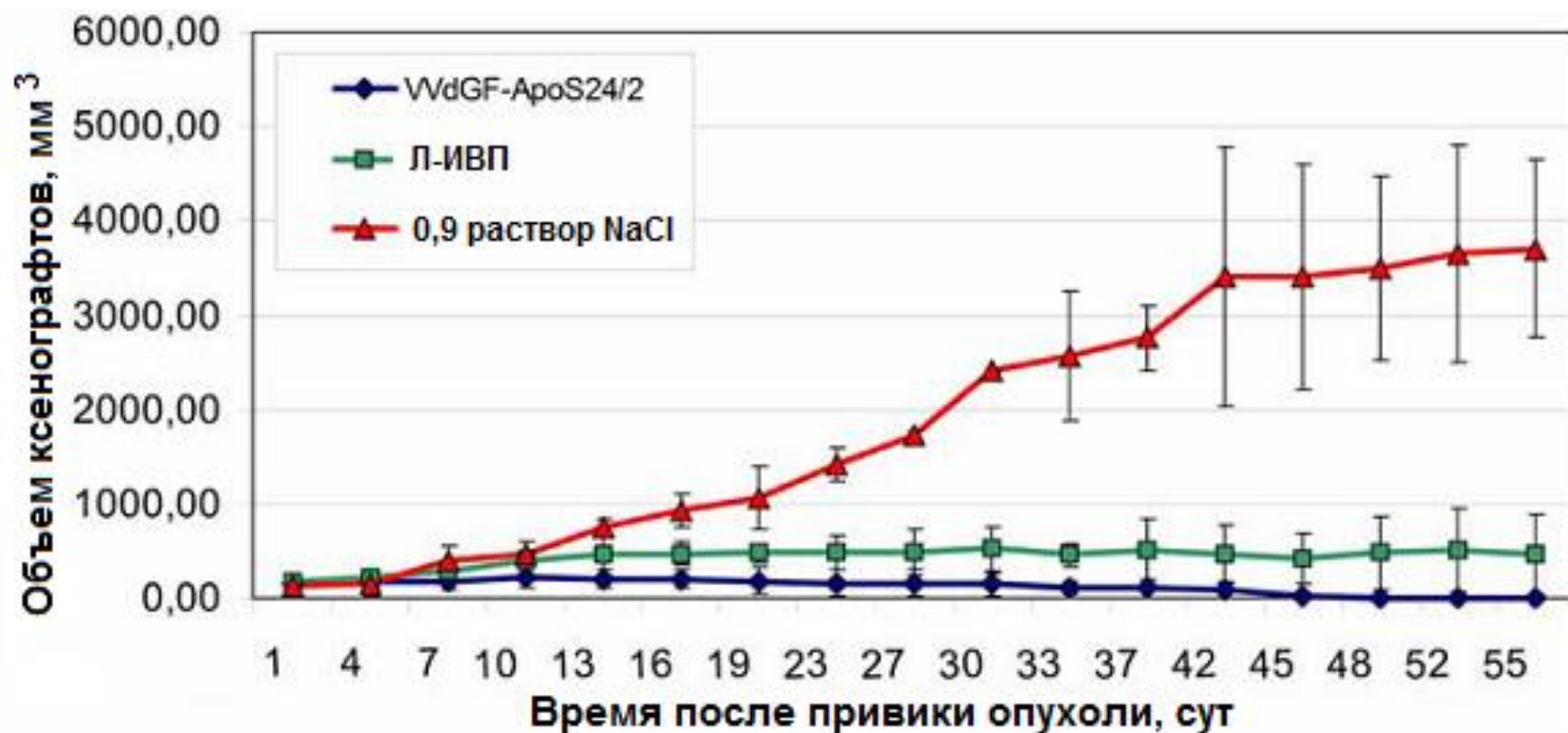
- 1. Однократное интратуморальное введение рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB приводит к значительному снижению объема ксенографтов человеческой и трансплантатов мышинной карциномы, привитых мышам.**
- 2. Экспрессия апоптина в составе генома штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB, не индуцирует апоптоз опухолевых клеток, но может приводить к накоплению в клетках филаментов цитоскелета и «аресту» клеточного цикла в S-фазе.**
- 3. Противоопухолевое действие штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB складывается из природных противоопухолевых свойств BOB и внутриклеточных взаимодействий белка апоптина. В основе механизма противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 может лежать прямое разрушение опухолевых клеток или снижение митотической активности опухолевых клеток.**

Моделирование человеческой опухоли

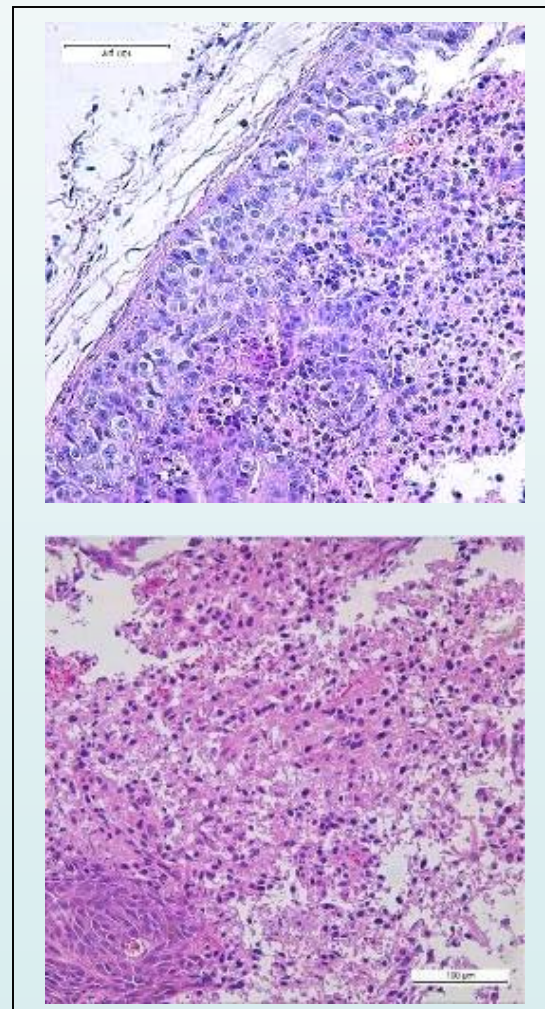
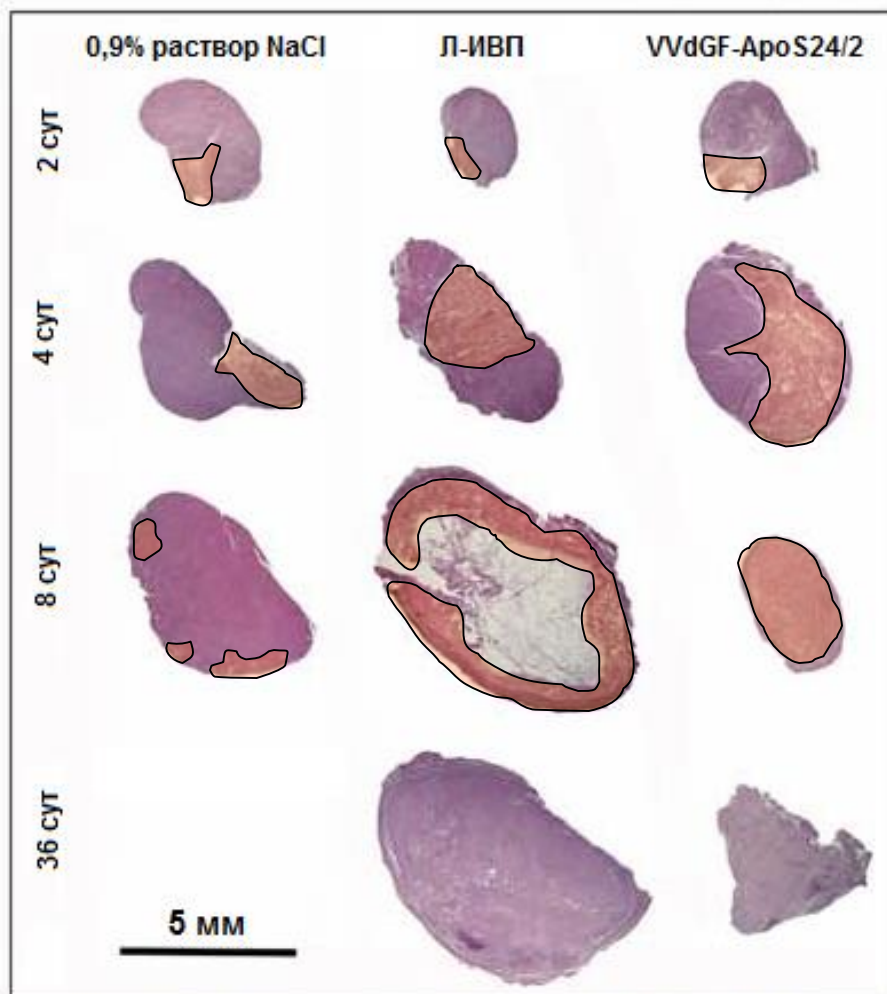


- Экспериментальная группа – введение **VVdGF-ApoS24/2 BOB**
(2×10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл физ. р-ра)
- Группа сравнения – введение **Л-ИВП BOB**
(2×10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл физ. р-ра)
- Контрольная группа – введение **100 мкл физ. р-ра.**

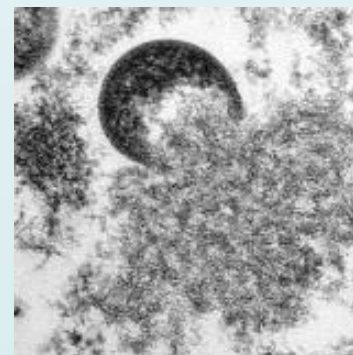
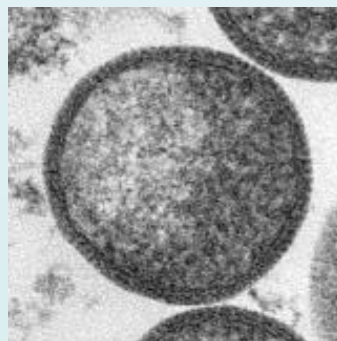
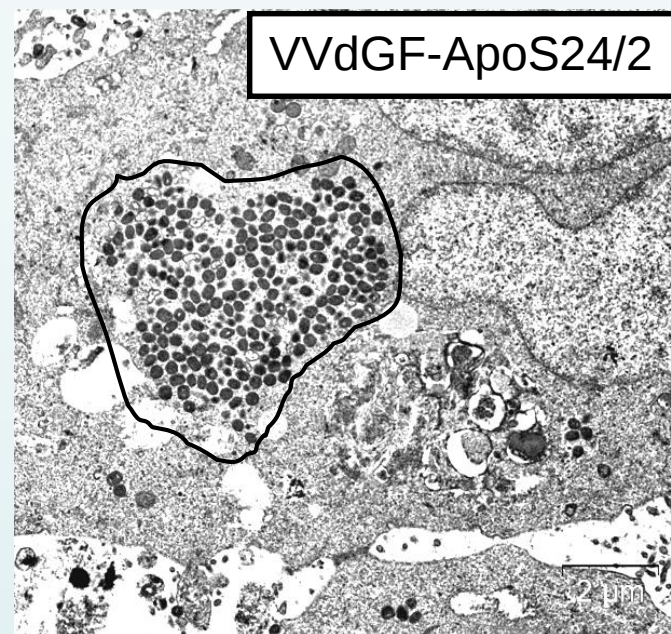
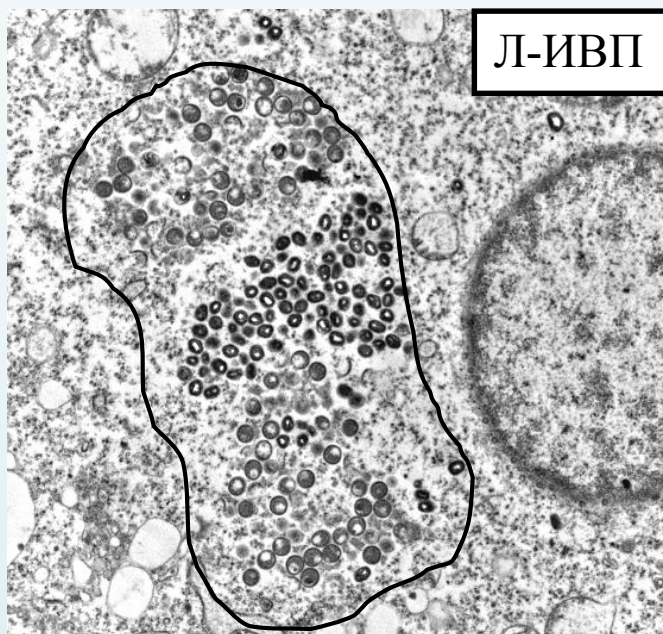
Уменьшение размеров ксенографтов карциномы А431 после интратуморального введения ВОВ



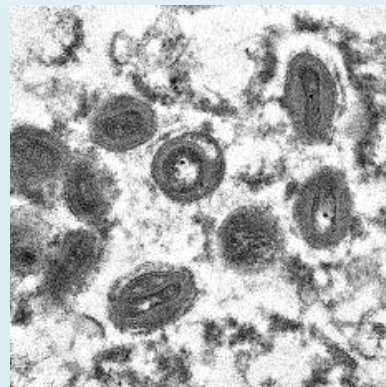
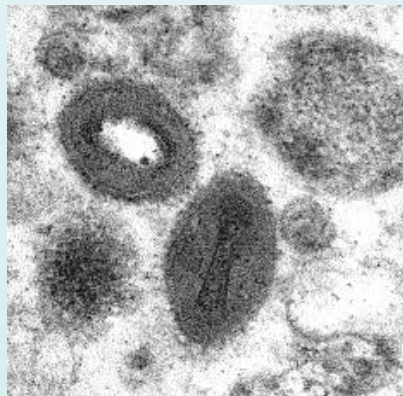
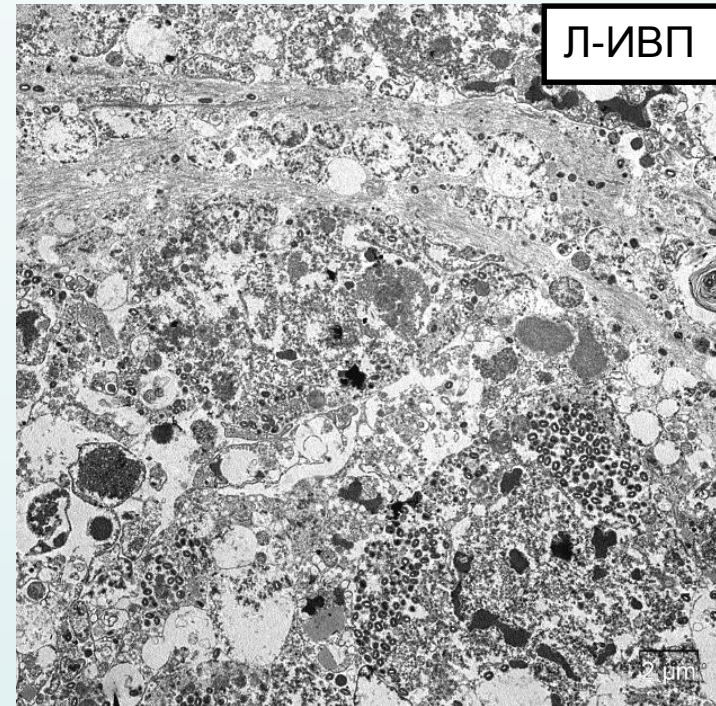
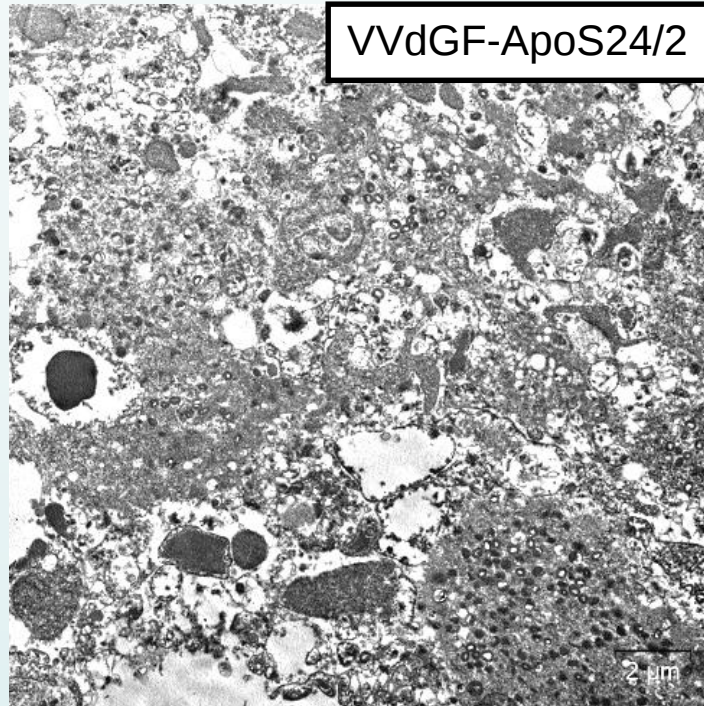
Развитие некротических изменений ксенографтов карциномы А431 при интратуморальном введении BOB



Морфологические характеристики репродукции рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2

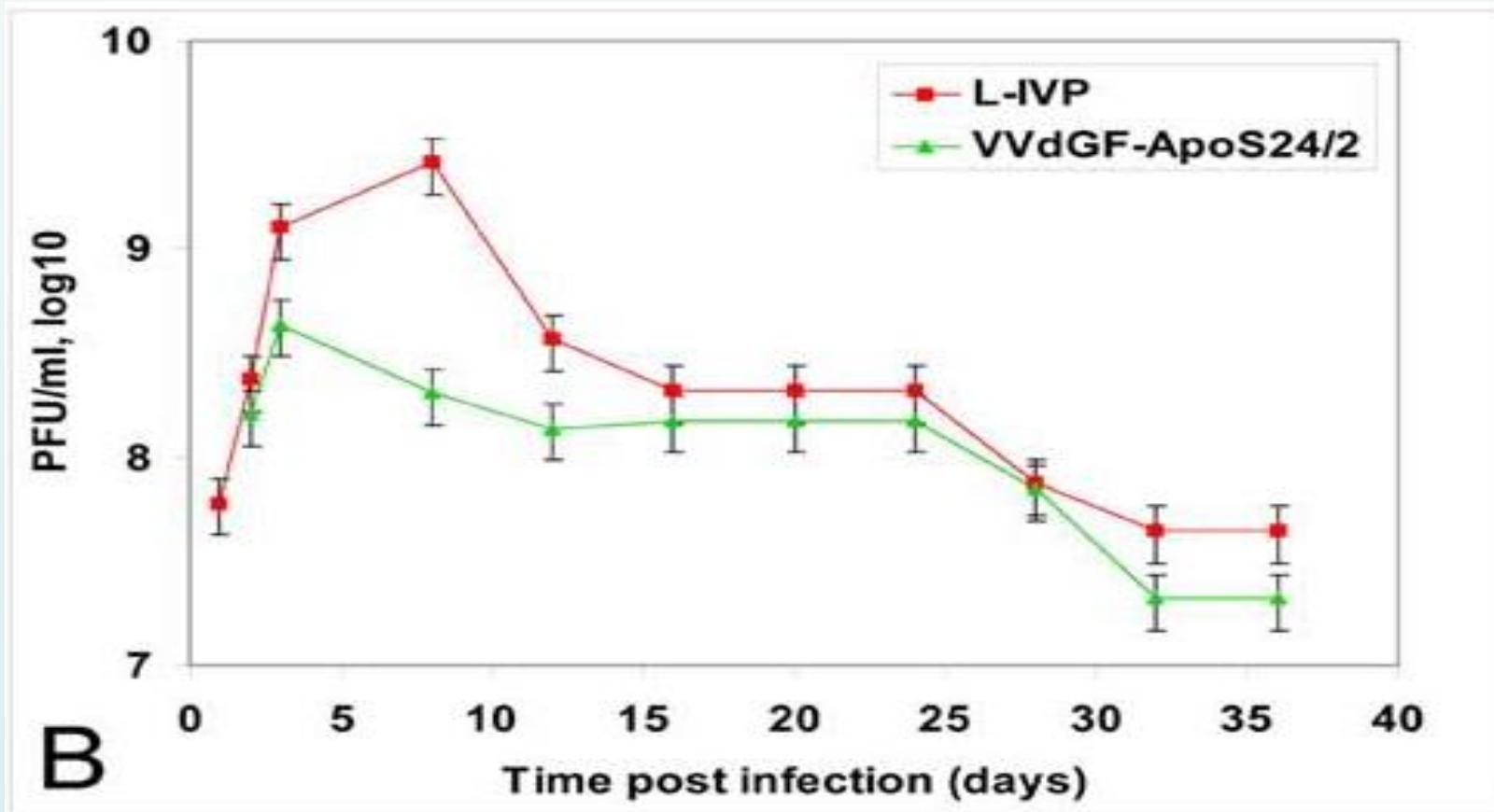


Разрушение клеток ксенографта карциномы A431 через 8 суток после введения BOB



**Отсутствуют
опухолевые клетки,
сохранившие свою
целостность**

Изменение содержания вирионов штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП ВОВ в гомогенатах ксенографтов карциномы А431

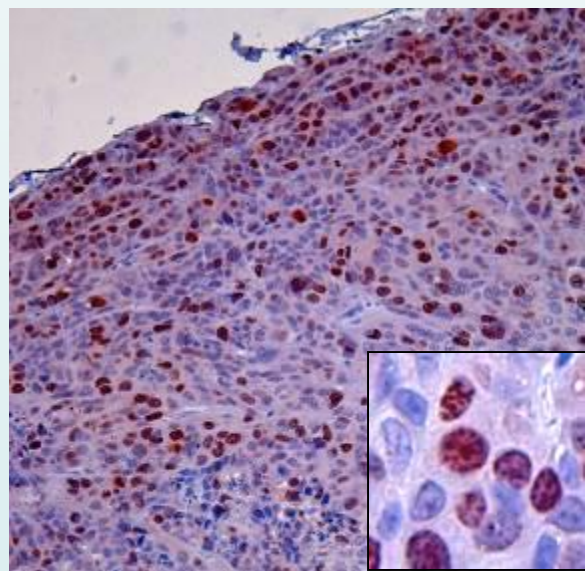


Иммуногистохимическое выявление клеток ксенографта карциномы А431, способных к пролиферации, с помощью анти-Ki-67 антител

2 суток п/в

Л-ИБП ВОВ

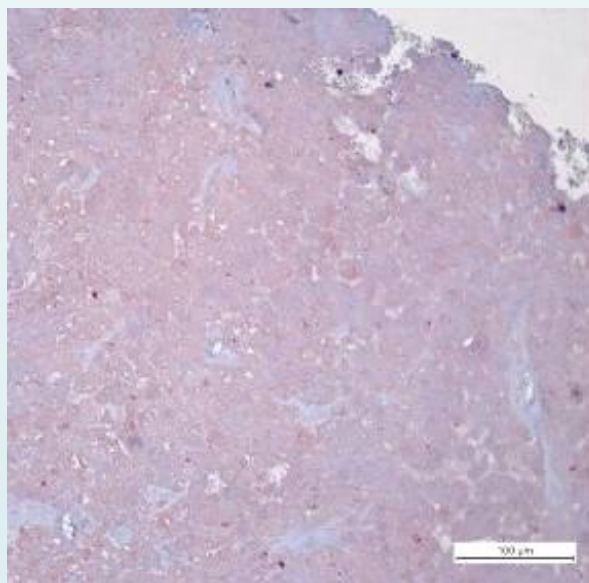
Позитивная реакция



8 суток п/в

VVdGF-ApoS24\2

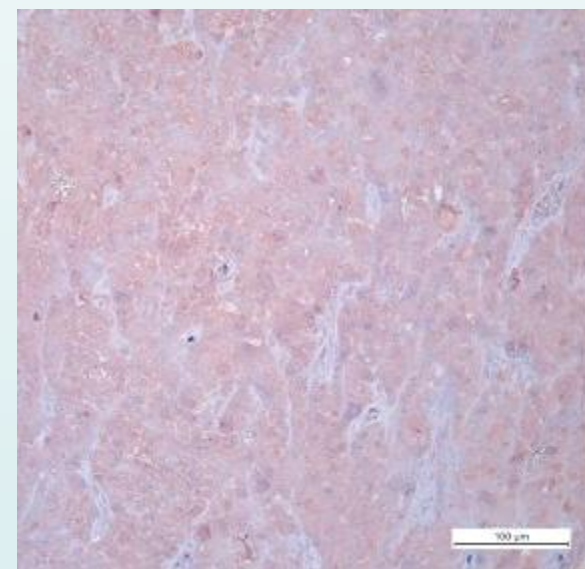
Негативная реакция



36 суток п/в

VVdGF-ApoS24\2

Негативная реакция

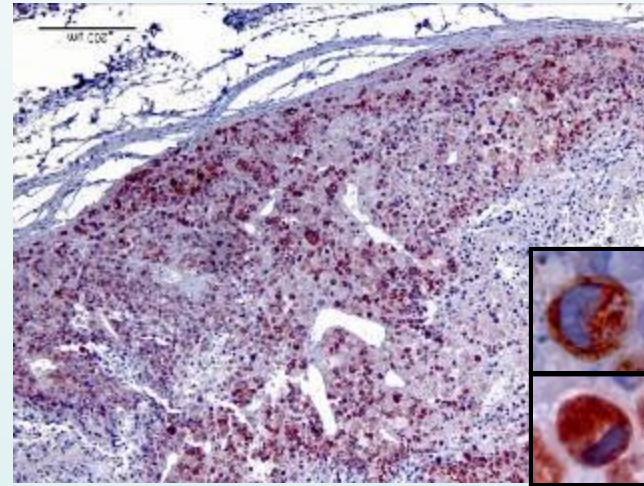
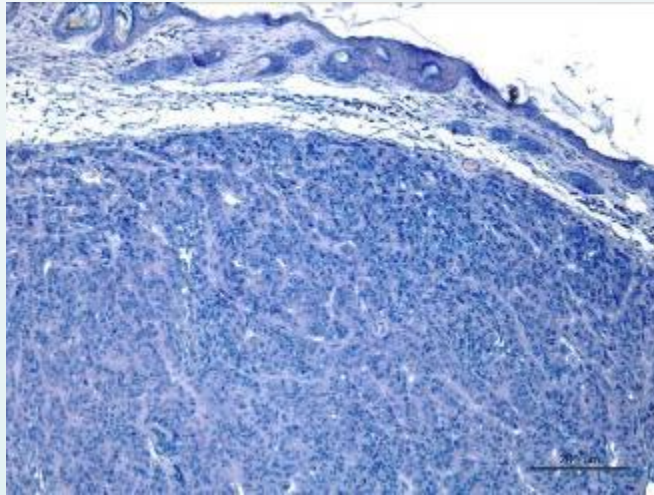


Иммуногистохимическое выявление белка апоптина, продуцируемого рекомбинантным ВОВ на парафиновых срезах карциномы А431

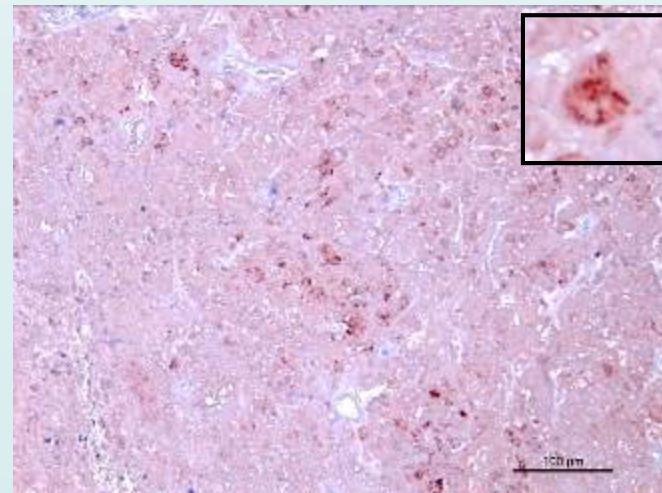
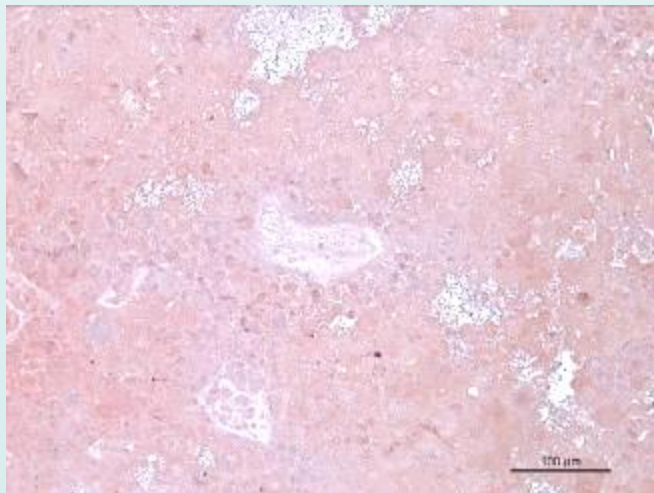
Л-ИВП ВОВ

VVdGF-ApoS24/2

2 суток п/в

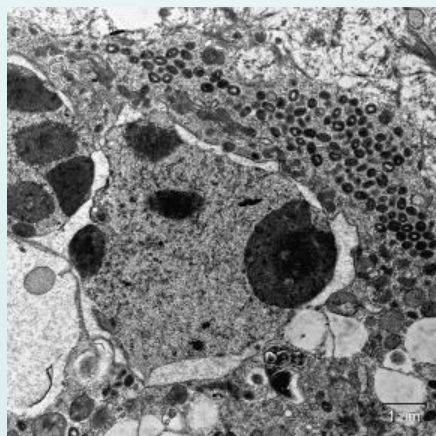


36 суток п/в

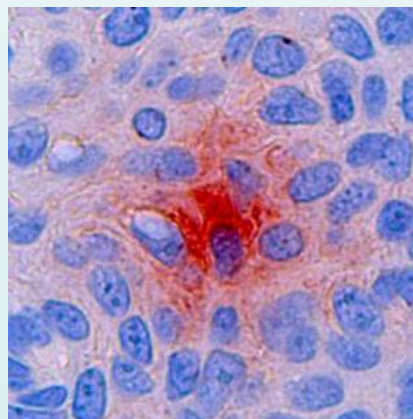


Экспрессия апоптина, продуцируемого штаммом VVdGF-ApoS24/2 не приводит к увеличению количества клеток ксенографта карциномы A431 в состоянии апоптоза (на мм² среза)

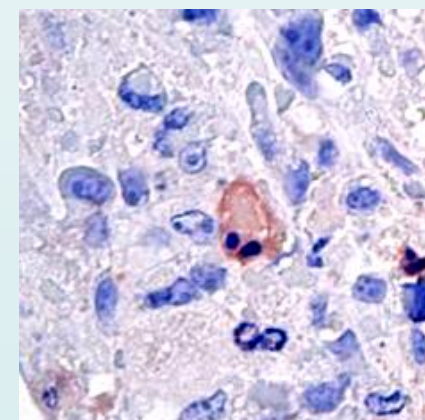
	2 сут п/в	4 сут п/в
0,9% раствор NaCl	16±2,1	10±2,4
VVdGF-ApoS24/2	72±3,8	72±3,8
Л-ИВП	77±3,7	67±3,5



Клетка ксенографта
карциномы A431 в
состоянии апоптоза



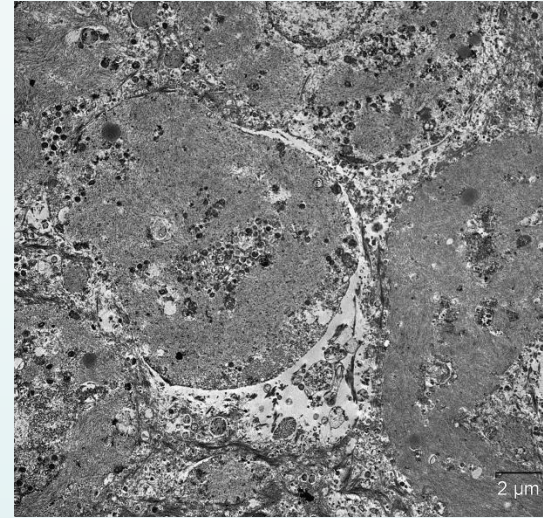
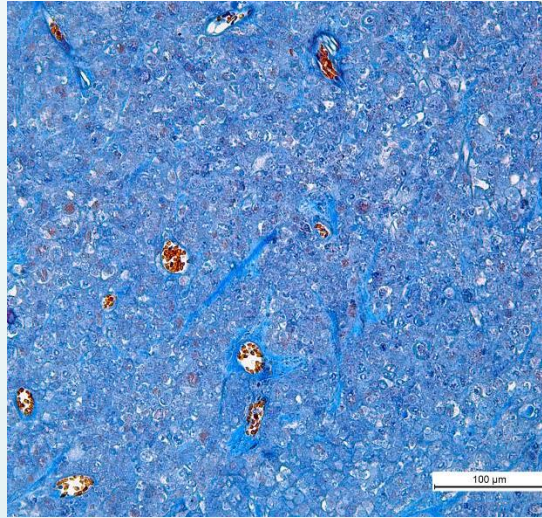
Араф-1



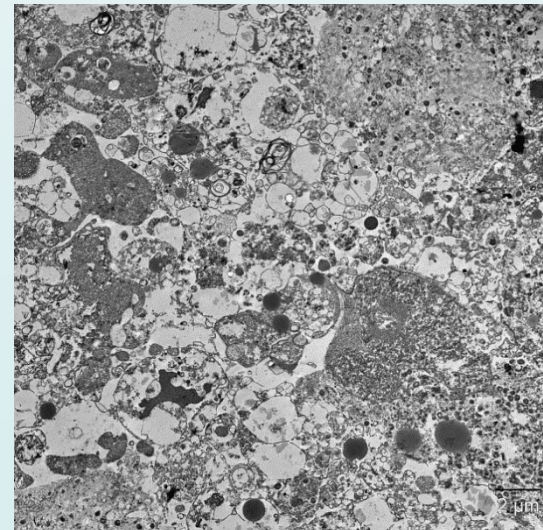
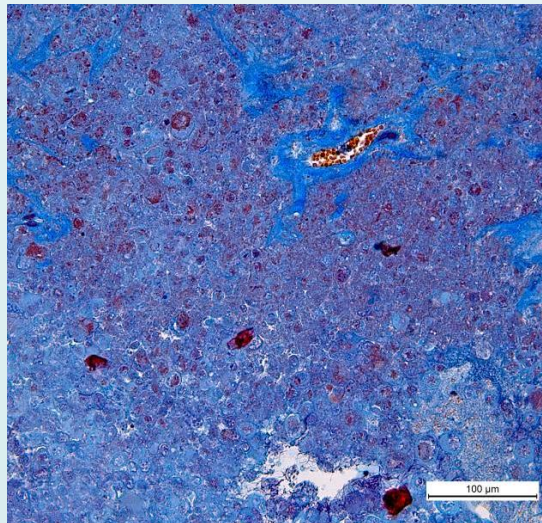
Каспаза-3

Накопление волокнистого материала в ткани ксенографтов карциномы A431 через 36 суток после введения штамма VVdGF- ApoS2/2

VVdGF-ApoS2/2



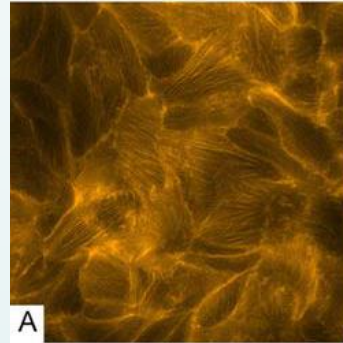
Л-ИВП ВОВ



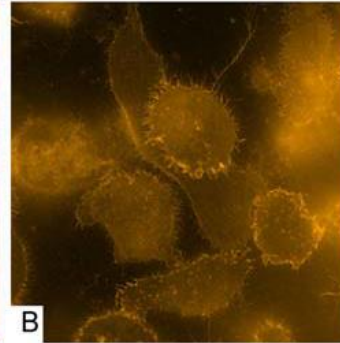
Актиновые филаменты в клетках карциномы A431, зараженных штаммом VVdGF-ApoS24\2 *in vitro*

Культура клеток,
окраска TRITC-
фаллоидином

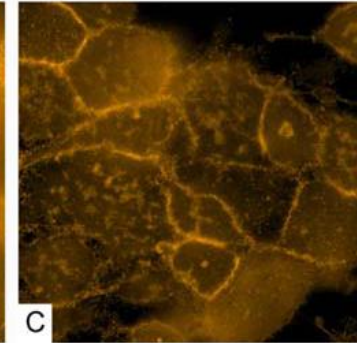
0,9 раствор NaCl



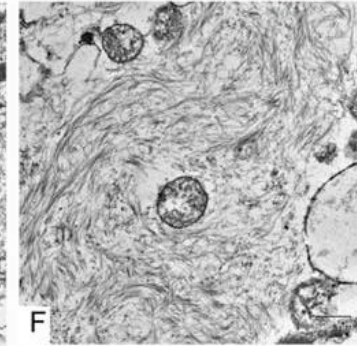
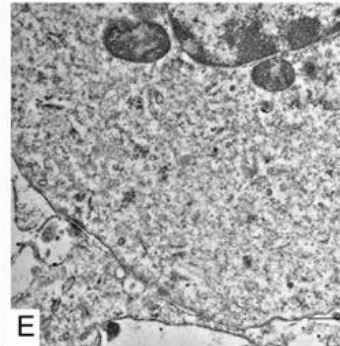
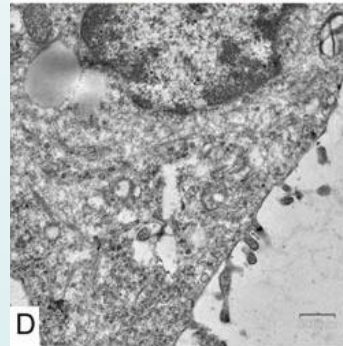
Л-ИБП



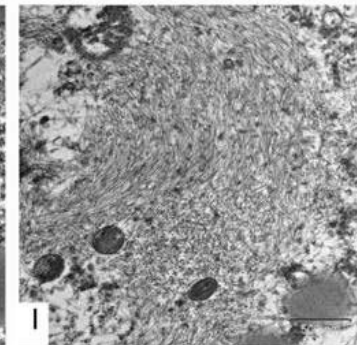
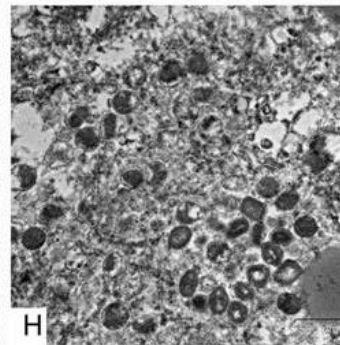
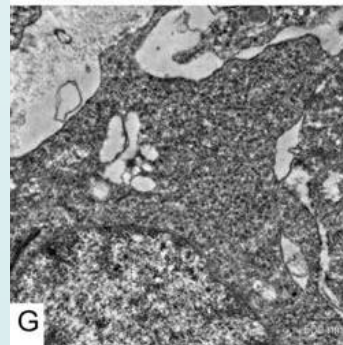
VVdGF-ApoS24/2



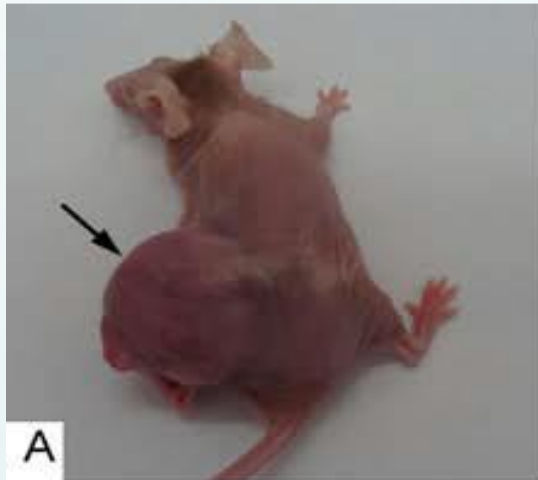
Культура клеток,
ультратонкий срез



Ксенографт A431,
ультратонкий срез



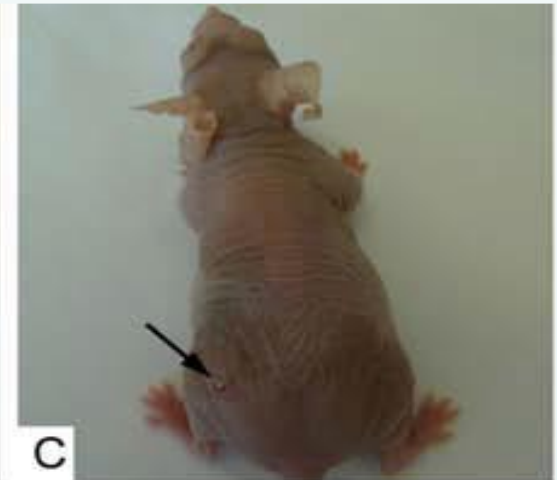
0,9% раствор NaCl



Л-ИБП

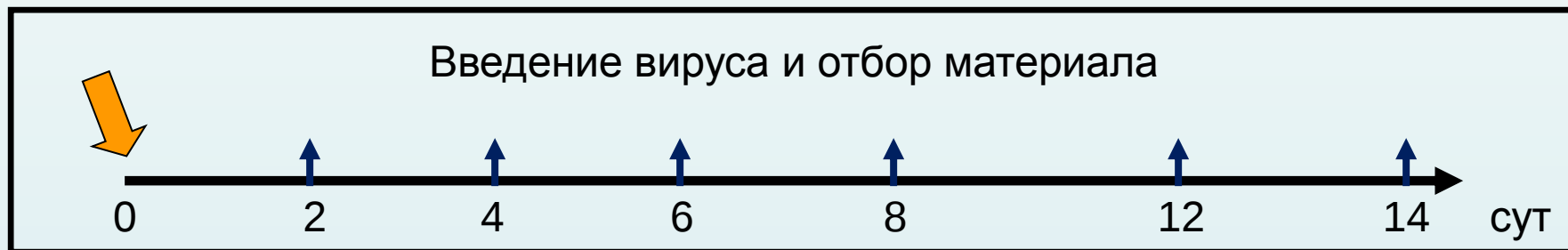
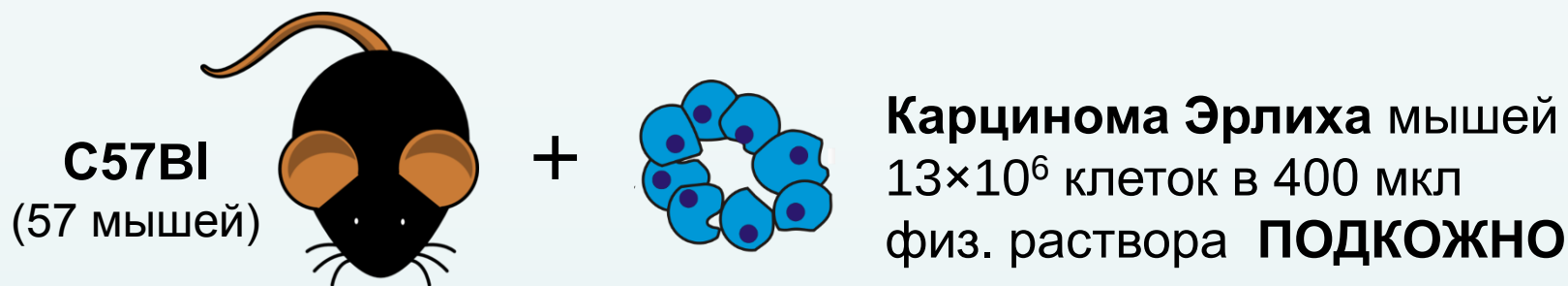


VVdGF-ApoS24/2



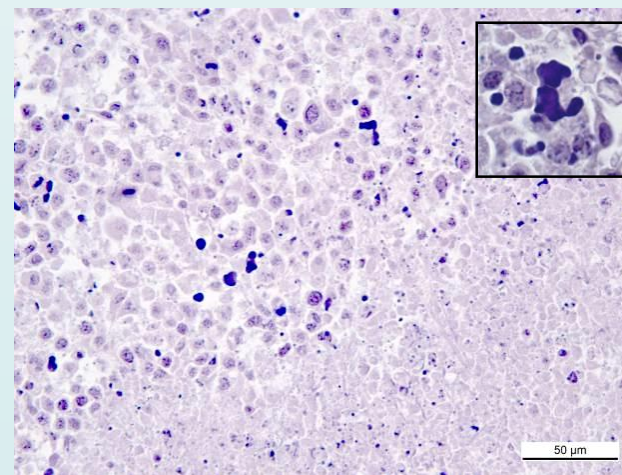
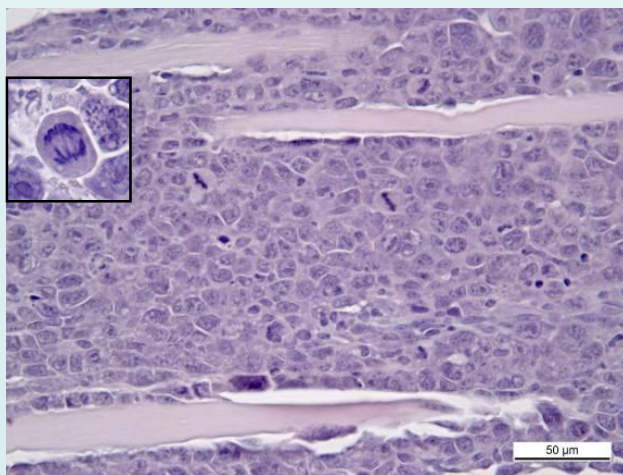
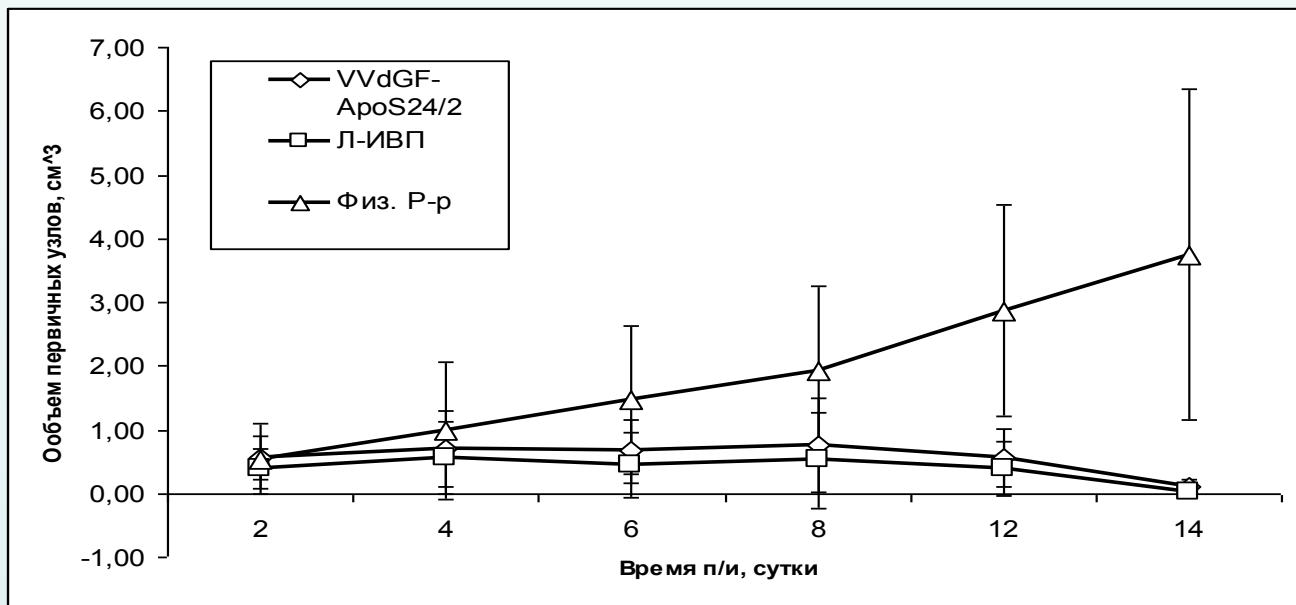
- Рекомбинантный штамм VVdGF-ApoS24/2 оказывает более выраженное противоопухолевое действие на ксенографты карциномы A3431 по сравнению с исходным штаммом Л-ИБП
- Апоптин, экспрессируемый штаммом VVdGF-ApoS24/2, не приводит к увеличению встречаемости клеток в состоянии апоптоза в клетках ксенографта карциномы A431
- Интратуморальное введение штамма VVdGF-аpoS24/2 приводит к накоплению в ткани ксенографтов карциномы A431 филаментов цитоскелета

Моделирование солидной карциномы Эрлиха мышей

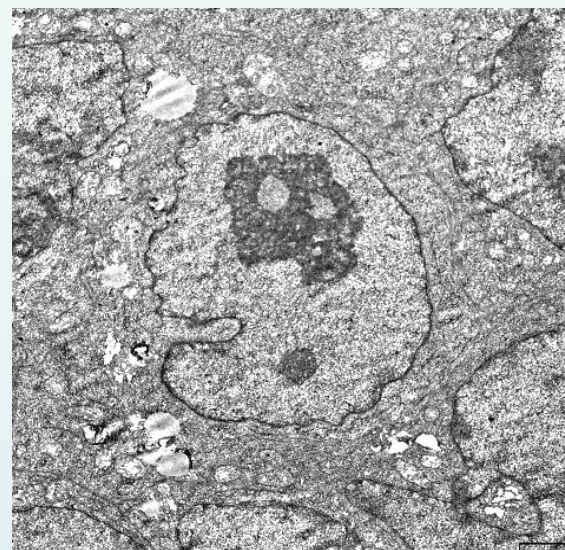
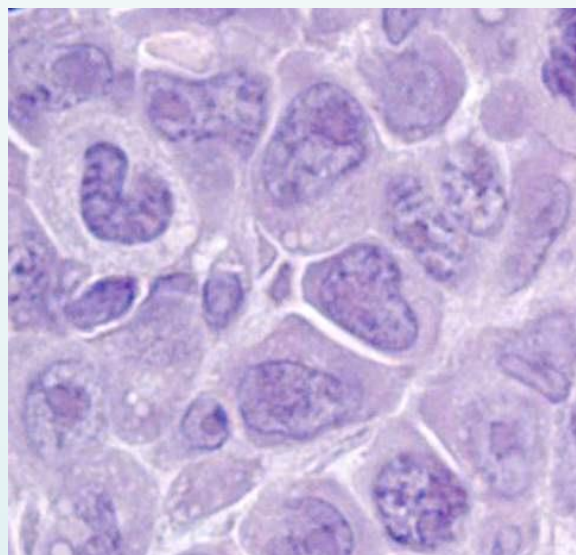
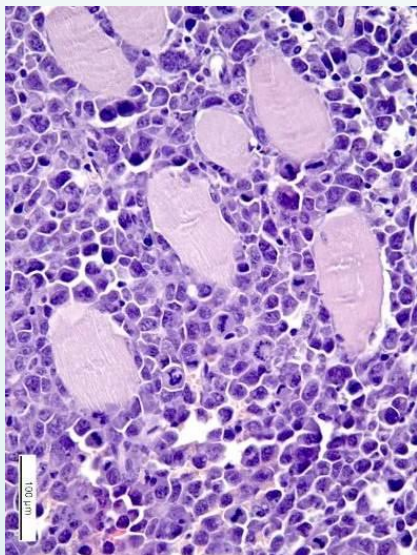


- Экспериментальная группа – введение **VVdGF-ApoS24/2 BOB**
(1×10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл физ. р-ра)
- Группа сравнения – введение **Л-ИВП BOB**
(1×10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл физ. р-ра)
- Контрольная группа – введение **100 мкл физ. р-ра.**

Уменьшение размеров трансплантатов карциномы Эрлиха после введения штаммов VVdGF-ApoS24\2 и Л-ИВП



Морфологические характеристики трансплантатов карциномы Эрлиха после интратуморального введения ВОВ



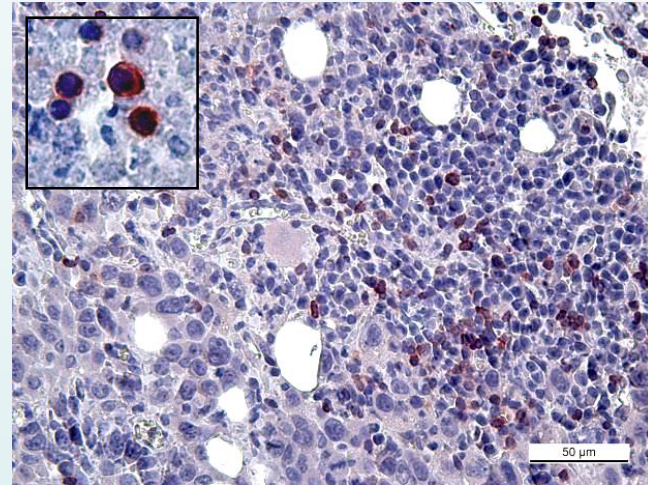
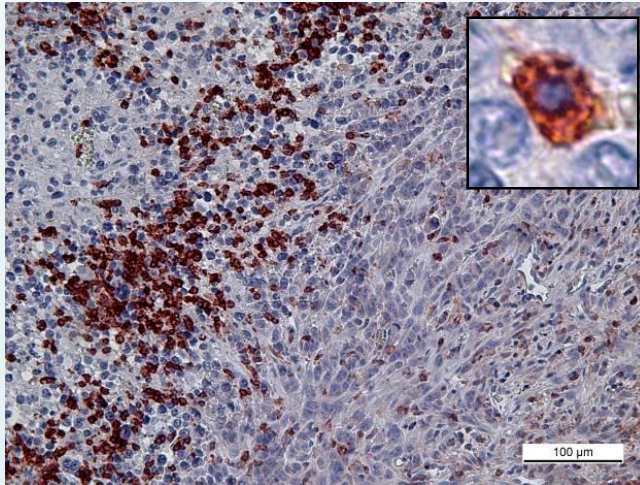
- ВОВ не оказывал деструктивного действия клетки солидной карциномы Эрлиха
- Процессы некроза и апоптоза не усиливаются после введения ВОВ
- Признаки размножения ВОВ в клетках солидной карциномы Эрлиха не обнаружены

Различия количества и распределения CD11b+ и CD3+ клеток в трансплантатах карциномы Эрлиха после введения штаммов ВОВ не обнаружены

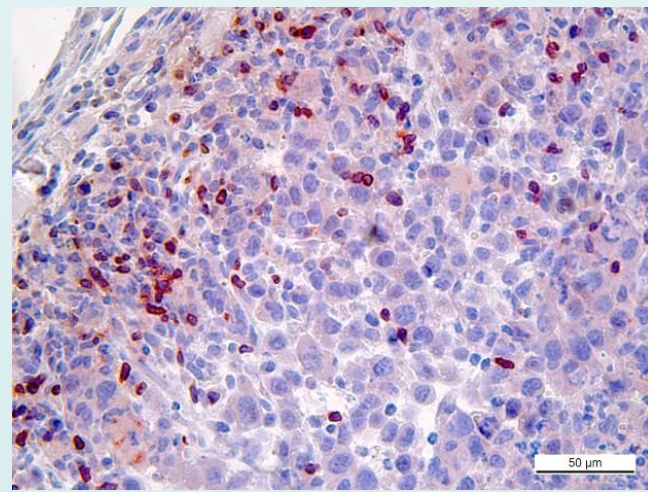
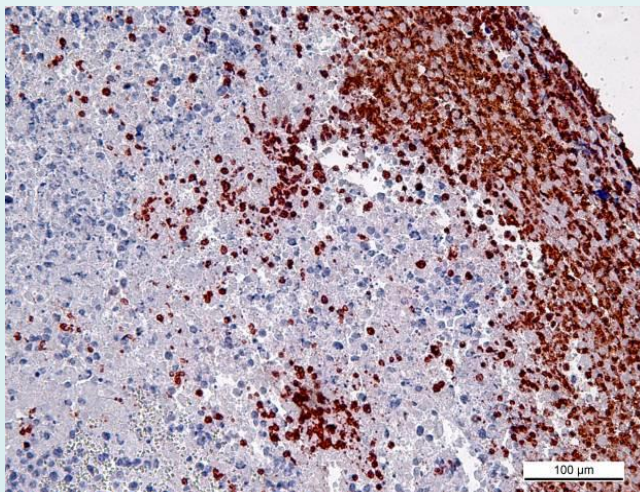
Моноциты/гранулоциты (CD11b+)

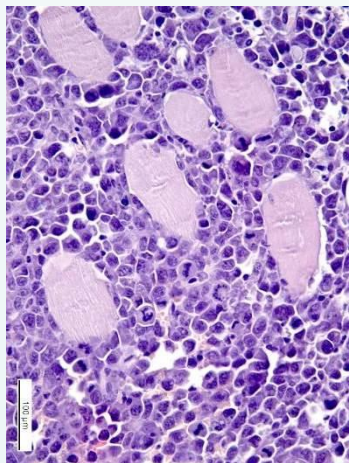
Т-клетки (CD3+)

0,9% раствор NaCl



VVdGF-ApoS24\2



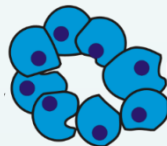


Моделирование роста асцитной опухоли мышей

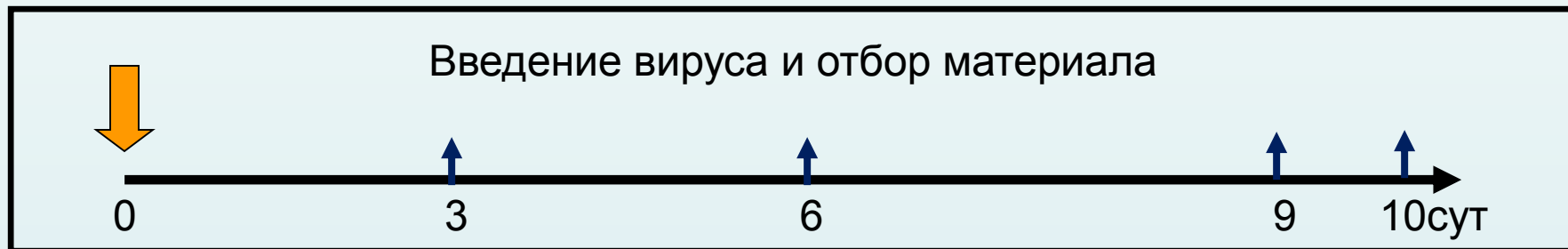
C57Bl
(39 мышей)



+

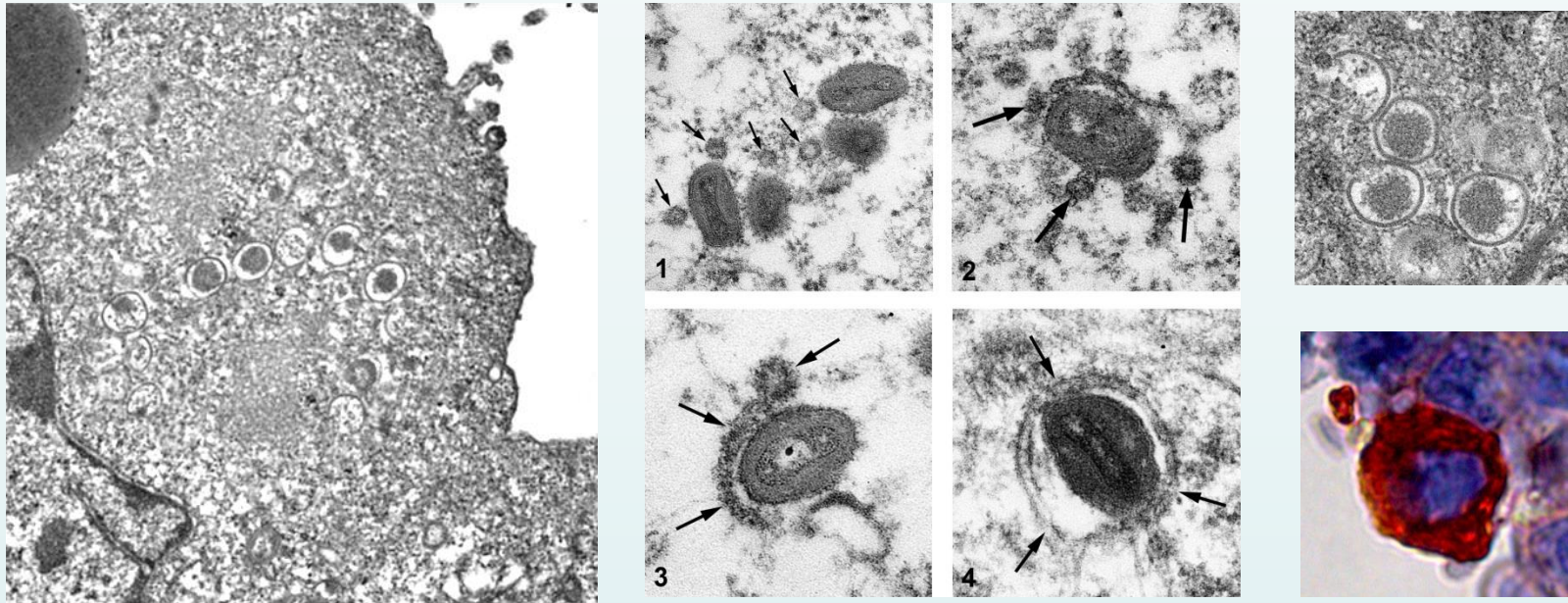


Карцинома Эрлиха мышей
 3×10^6 клеток в 200 мкл
физ. раствора
ВНУТРИБРЮШИННО



- Экспериментальная группа – введение **VVdGF-ApoS24/2 BOB**
($1,6 \times 10^7$ БОЕ/мышь в 100 мкл физ. р-ра)
- Группа сравнения – введение **Л-ИВП BOB**
($1,6 \times 10^7$ БОЕ/мышь в 100 мкл физ. р-ра)
- Контрольная группа – введение **100 мкл физ. р-ра.**
- Образцы – осадки асцитической жидкости с клетками.

Репликация штаммов BOB в клетках асцитной карциномы Эрлиха происходила на крайне низком уровне

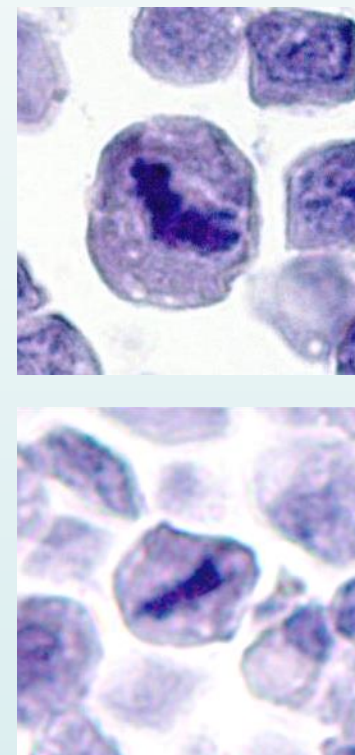
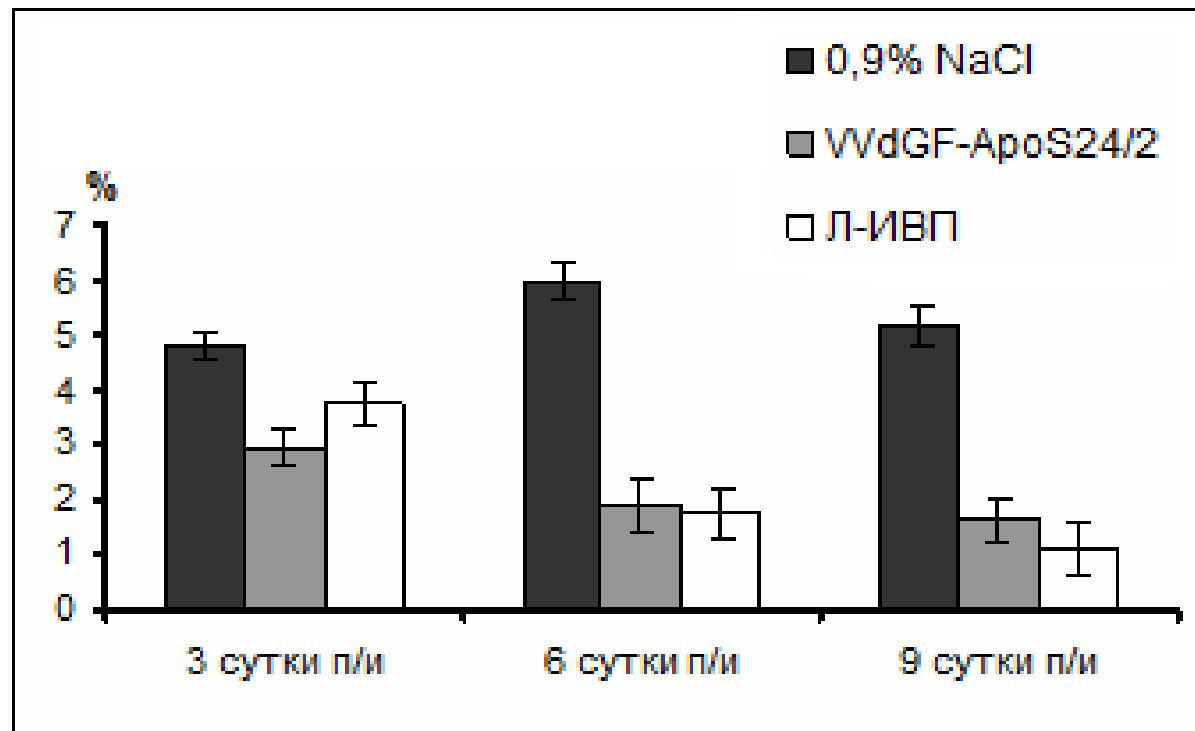


Размножение BOB происходило в **4-5 клетках** асцитной карциномы Эрлиха из **1000** (оценочные данные, полученные на основе ИГХ-выявления комплекса FLAG-апоптин на парафиновых срезах).

Размножение штаммов BOB сопровождалось формированием большого количества «одетых» вирионов.

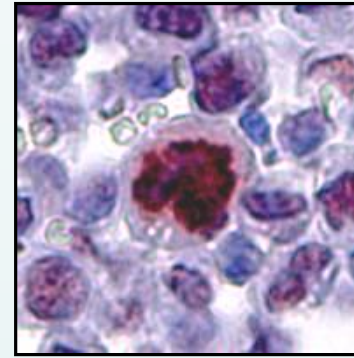
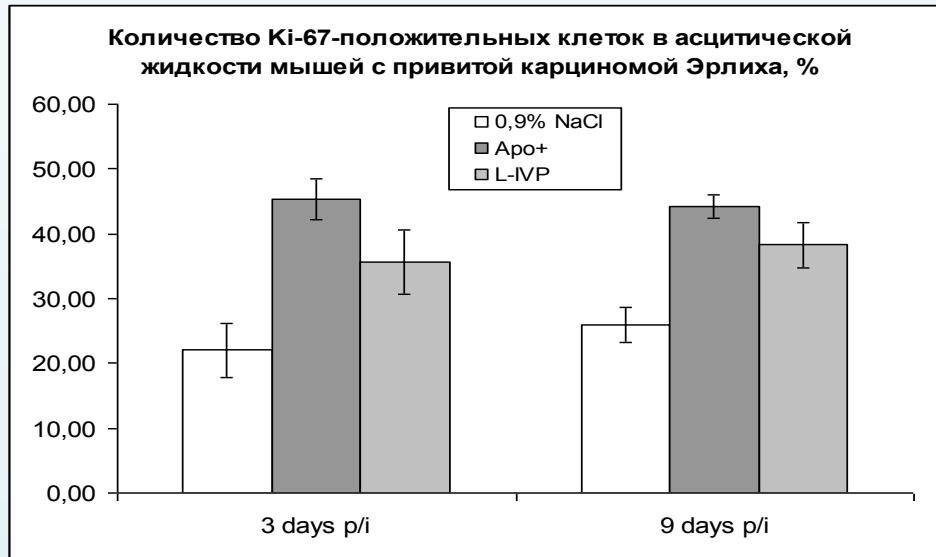
Титр вируса колебался от 10^2 до 10^5 БОЕ/мл асцитической жидкости

Уменьшение количества клеток асцитной карциномы Эрлиха в состоянии митоза после введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП

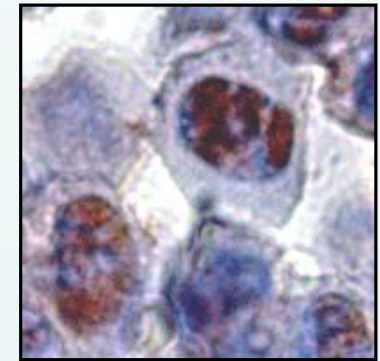


Различия достоверны, $P < 0,05$

Количество Ki-67+ и PCNA+ клеток асцитной карциномы Эрлиха достоверно снижалось ($P<0,05$) после введения штаммов BOB

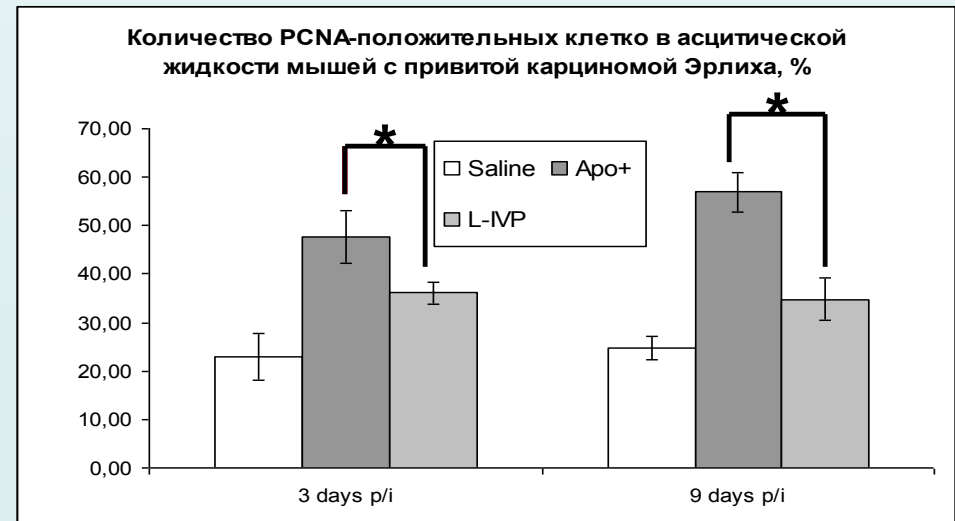


Ki-67
Маркер клеток, способных к пролиферации



PCNA
Маркер S-фазы клеточного цикла

Штамм VVdGF-ApoS24/2 «останавливает» клеточный цикл асцитной карциномы Эрлиха с большей частотой по сравнению с штаммом Л-ИВП (* $P<0,05$)



ВЫВОДЫ

- 1. Рекомбинантный апоптин-продуцирующий штамм VVdGF-ApoS24/2 BOB активно реплицируется с формированием морфологически полноценных вирионов в клетках ксенографтов карциномы A431 человека и очень слабо - в клетках асцитной карциномы Эрлиха мышей. Уровень репликации рекомбинантного штамма вируса ниже, чем исходного штамма Л-ИБП. Репликация BOB VVdGF-ApoS24/2 сопровождается экспрессией белка апоптина, который не проникает в ядра клеток.**
- 2. Противоопухолевый эффект штамма VVdGF-ApoS24/2 при введении в ксенографты и трансплантаты карциномы Эрлиха мышей более выражен, чем у штамма Л-ИБП BOB. Основным механизмом регрессии ксенографтов карциномы A431 является прямое разрушение опухолевых клеток вследствие репродукции рекомбинантного штамма BOB, сопровождающееся накоплением в опухоли филаментов цитоскелета. В случае карциномы Эрлиха основным механизмом противоопухолевого действия штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB является «остановка» клеточного цикла в S-фазе, что приводит к замедлению роста опухоли.**

ВЫВОДЫ

- 3. Штамм VVdGF-ApoS24/2 вызывает снижение количества клеток ксенографтов карциномы A431 и трансплантатов карциномы Эрлиха в состоянии митоза и с большей частотой вызывает «остановку» в S-фазе клеточного цикла клеток трансплантатов карциномы Эрлиха по сравнению со штаммом Л-ИВП ВОВ. Штамм VVdGF-ApoS24/2 не вызывает увеличения частоты встречаемости апоптоза в клетках ксенографтов карциномы A431 человека и трансплантатов карциномы Эрлиха мышей.**

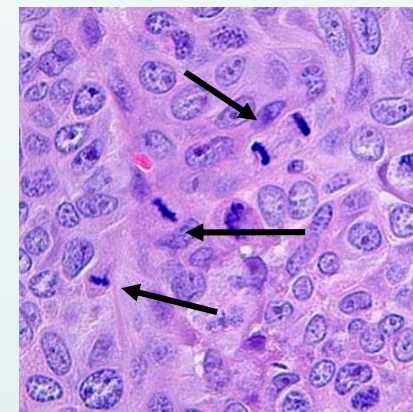
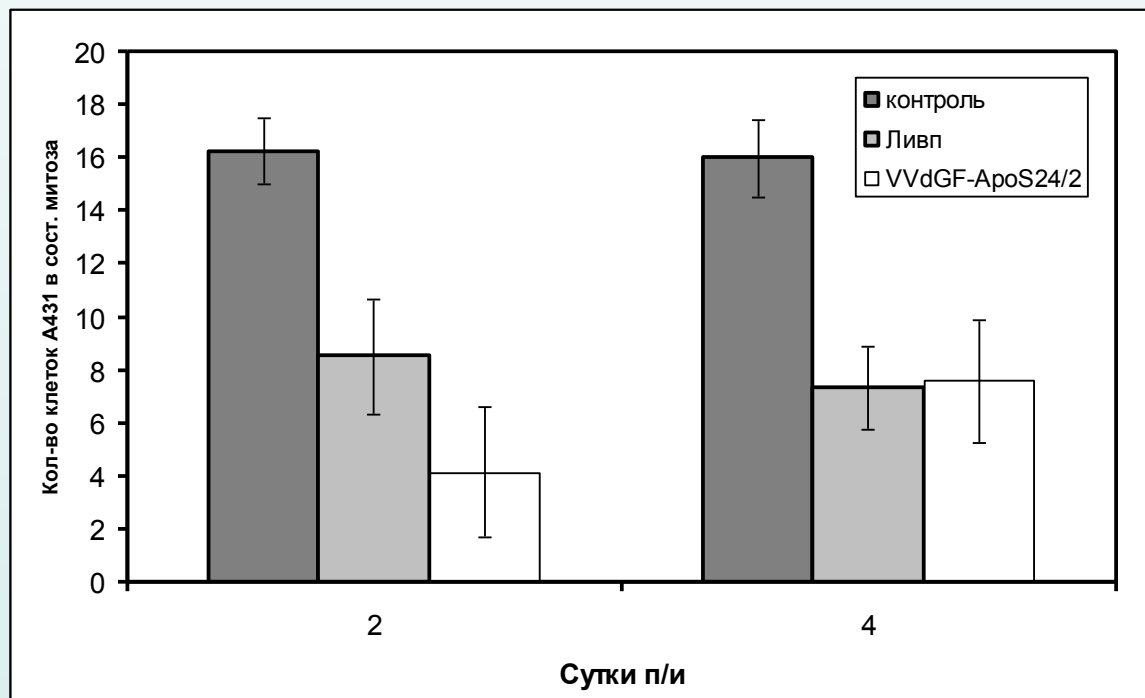
Благодарности

Автор приносит благодарность за помощь в работе сотрудникам ГНЦ ВБ «Вектор» Кочневой Галине Вадимовне, Гражданцевой Антонине Александровне и Таранову Олегу Святославовичу за помощь в проведении работы.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам группы микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН, научному руководителю, Рябчиковой Елене Ивановне.

1. Galina Kochneva, **Evgeniy Zonov**, Antonina Grazhdantseva, Anastasiya Yunusova, Galina Sibolobova, Evgeniy Popov, Oleg Taranov, Sergei Netesov, Peter Chumakov, Elena Ryabchikova. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression// *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5. - № 22. – С. 11269-82.
2. Юнусова А.Ю., **Зонов Е.В.**, Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И. Морфология ксенографтов карциномы А431 человека у мышей линии nude// *Вестник НГУ*. – 2014. – Том 12. – Выпуск 3. – С. 42-48.
3. **Evgeniy Zonov**, Galina Kochneva, Anastasiya Yunusova, Antonina Grazhdantseva, Vladimir Richter, Elena Ryabchikova. Features of the Antitumor Effect of Vaccinia Virus Lister Strain// *Viruses*. - 2016. –Vol. 8. - № 1.
4. **Зонов Е.В.**, Кочнева Г.В., Тупицына А.В., Рябчикова Е.И. Противоопухолевый эффект апоптин-продуцирующего рекомбинантного штамма осповакцины *in vivo* связан с блокированием митотического деления опухолевых клеток// *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2016. - № 4. - стр.154-159.

Уменьшение количества клеток ксенографта карциномы А431 в состоянии митоза после введения штаммов VVdGF-ApoS24/2 и Л-ИВП



Различия
достоверны,
 $P < 0,05$