

На правах рукописи



ТРОИЦКАЯ ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ ИНДУЦИРОВАТЬ
ИММУНОГЕННУЮ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК**

1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2022

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

Научный руководитель:

Коваль Ольга Александровна, д.б.н.

Официальные оппоненты:

Логашенко Евгения Борисовна, к.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО
РАН., с.н.с.

Колосова Наталия Гориславовна, д.б.н., профессор,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и
генетики СО РАН», г.н.с, зав. лаб.

Трифонов Владимир Александрович, д.б.н.,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, в.н.с, зав.
лаб.

Защита состоится «8» июля 2022 г. в 10:00

на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте <http://www.niboch.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

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



Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время большое внимание уделяют феномену вовлечения иммунной системы в реализацию противоопухолевого эффекта цитостатической терапии. Одной из успешных противоопухолевых стратегий, отличных от хирургического вмешательства, является стратегия «двойного действия», когда противоопухолевый агент напрямую индуцирует гибель большинства раковых клеток, а погибающие клетки активируют иммунную систему, формируя специфический иммунный ответ на опухолевые антигены, что ведет к уничтожению оставшихся опухолевых клеток. Таким требованиям удовлетворяют индукторы иммуногенной клеточной гибели (Immunogenic Cell Death, ICD). Иммуногенность погибающих клеток можно определить по активации в них определенной комбинации сигналов опасности, что способствует узнаванию и поглощению этих клеток антигенпрезентирующими клетками, процессингу, презентации опухолевых антигенов и ведет к активации антиген-специфических Т-лимфоцитов. Поэтому, терапевтические индукторы ICD могут иметь преимущество как в борьбе с метастазирующими опухолями, так и для разработки подходов противоопухолевой иммунизации.

Ранее было показано, что рекомбинантный аналог цитотоксического белка лактапина из молока человека (RL2) вызывает гибель опухолевых клеток с активацией маркеров различных типов программируемой гибели – апоптоза, АТФ-зависимого некроза и митофагии. Определены режимы внутривенного введения RL2, вызывающие эффект торможения роста солидных опухолей у мышей (Koval O. et al., 2014). Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующий лактапин и GM-CSF человека, был сконструирован генно-инженерным путем для усиления противоопухолевых свойств вируса. Было показано, что рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact эффективно подавляет рост солидных опухолей у мышей при внутриопухолевом и внутривенном введении (Kochneva G. et al., 2016). При использовании электрофизического устройства, сконструированного в ИФП СО РАН и позволяющего варьировать параметры плазменной струи, было показано цитотоксическое действие холодной плазменной струи на клетки аденокарциномы легкого A549 (Golubitskaya E., et al., 2019). Тем не менее, возможность индукции именно иммуногенного типа гибели в клетках, обработанных RL2, зараженных вирусом VV-GMCSF-Lact или облученных холодной плазменной струей, ранее не была изучена.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось исследование и сравнение эффективности индукции иммуногенного типа клеточной гибели новых потенциальных противоопухолевых препаратов на основе аналога лактапина и подхода для противоопухолевой терапии с использованием струи холодной плазмы.

В ходе исследования решались **следующие задачи:**

1. Анализ активации молекулярных маркеров иммуногенной гибели (ICD) в опухолевых клетках при воздействии рекомбинантного аналога лактаптоина RL2, рекомбинантных вирусов осповакцины и холодной плазменной струи в экспериментах *in vitro*. Оценка влияния цитотоксических белков лактаптоина или апоптоина в составе рекомбинантных вирусов осповакцины на способность вируса активировать маркеры ICD в зараженных клетках.
2. Исследование эффекта противоопухолевой вакцинации погибающими опухолевыми клетками, обработанными RL2 или рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact, *in vivo*. Оценка влияния ингибиторов индоламин-2,3-диоксигеназы на противоопухолевую вакцинацию клетками, обработанными RL2.
3. Анализ изменения концентрации ядерного негистонового белка HMGB1 в сыворотке крови мышей после облучения холодной плазменной струей.
4. Подтверждение иммуногенности опухолевых клеток, обработанных RL2, вирусом VV-GMCSF-Lact или струей холодной плазмы, при взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками иммунной системы.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.

В данном исследовании впервые была показана способность аналога лактаптоина RL2, рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact и холодной плазменной струи (ХПС) индуцировать гибель опухолевых клеток с признаками ICD *in vitro*. Впервые показано, что вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток выше, чем вакцинирующий эффект опухолевых клеток, зараженных рекомбинантным вирусом осповакцины. Показано, что использование ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы усиливает противоопухолевый эффект при вакцинации опухолевыми клетками, обработанными RL2. Показано, что введение гена лактаптоина в геном вируса осповакцины не влияет на способность вируса индуцировать гибель клеток по иммуногенному типу. Впервые показано увеличение уровня белка HMGB1 в сыворотке крови животных-опухоленосителей после облучения опухолей ХПС. Установлено, что опухолевые клетки, погибающие под действием RL2, наиболее эффективно поглощаются антигенпрезентирующими клетками *in vitro* и *in vivo* и стимулируют созревание дендритных клеток. Сравнение уровня и динамики активации маркеров ICD в обработанных указанными индукторами клеток показало, что наиболее эффективным индуктором ICD и активатором эффекта вакцинации является аналог лактаптоина RL2.

Положения, выносимые на защиту

1. Рекомбинантный аналог лактаптоина RL2 индуцирует гибель опухолевых клеток с признаками иммуногенного типа гибели *in vitro*. RL2 вызывает изменения в опухолевых клетках, ведущие к их захвату антигенпрезентирующими клетками, и стимулирует в них экспрессию МНС II.

2. Гибнущие опухолевые клетки, обработанные аналогом лактапина RL2, обладают противоопухолевым вакцинирующим эффектом *in vivo*. Вакцинация суммарным пулом RL2-обработанных клеток оказывает больший вакцинирующий эффект, чем вакцинация только клетками в состоянии позднего апоптоза/некроза.
3. Ингибирование фермента индоламин-2,3-диоксигеназы этилпириватом усиливает противоопухолевый вакцинирующий эффект суммарного пула клеток, обработанных RL2.
4. Рекомбинантные вирусы осповакцины при заражении опухолевых клеток вызывают изменение молекулярных маркеров ICD *in vitro* без реализации противоопухолевой вакцинации *in vivo*.
5. Облучение опухолевых клеток холодной плазменной струей индуцирует активацию маркеров иммуногенной клеточной гибели *in vitro*.
6. Облучение зоны опухоли у мышей холодной плазменной струей ведет к повышению концентрации белка HMGB1 в сыворотке крови животных.

Публикации и апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы. Основные результаты работы были представлены на следующих международных конференциях: всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия-2017» (Новосибирск, 2017), международном 43м конгрессе и форуме молодых ученых FEBS «Biochemistry Forever» (Прага, Чехия, 2018), международном молодежном форуме «FEBS Advance Course Current Advances in Pathogen Research» (Ереван, Армения, 2019), мультikonференции «Биотехнология-медицине будущего» (Новосибирск, 2019), 27й конференции ECDO «Cell death and Regeneration» (Дрезден, Германия, 2019), международном 45м конгрессе FEBS «Molecules of life: Toward new horizons» (онлайн-конференция, 2021).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка цитированной литературы. Работа изложена на 155 страницах, включает 46 рисунков и 4 таблицы. Список литературы содержит 258 литературных источников.

Вклад автора. Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. Эксперименты на мышах были проведены совместно со студентами и аспирантами лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН. Рекомбинантные вирусы осповакцины были предоставлены Кочневой Г. В. (ГНЦ «Вектор»). Нарботка и очистка RL2 была проведена м.н.с. лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН Чинак О.А. Эксперименты по исследованию свойств холодной плазмы были проведены совместно с д.ф.-м.н. Закревским Д.Э. (ИФП СО РАН) и д.ф.-м.н. Швейгерт И.В. (ИТПМ СО РАН).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Рекombинантный аналог лактапина RL2

1.1. Анализ активации маркеров ICD под действием RL2 in vitro

Для исследования индукции иммуногенной клеточной гибели рекомбинантным аналогом лактапина RL2 опухолевые клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и рабдомиосаркомы мыши MX-7 инкубировали с RL2 и затем в них анализировали изменение характерных молекулярных маркеров ICD: экспозицию кальретикулина (CRT) и HSP70 на внешнюю мембрану клетки и высвобождение АТФ и HMGB1 в межклеточное пространство.

1.1.1. Исследование экспозиции кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану под действием RL2

В результате обработки RL2 уровень белка CRT снижался через 8 ч инкубации как в клетках MDA-MB-231, так и в клетках MX-7 (Рис. 1А-Г). При анализе поверхностного CRT можно видеть, что инкубация с RL2 ведет к увеличению доли клеток с фенотипом CRT⁺ до 46%, что указывает на RL2-индуцированную транслокацию CRT на внешнюю плазматическую мембрану из ЭПР (Рис. 1Д). В качестве препарата сравнения использовали индуктор иммуногенной гибели клеток препарат доксорубин (Рис. 1Д).

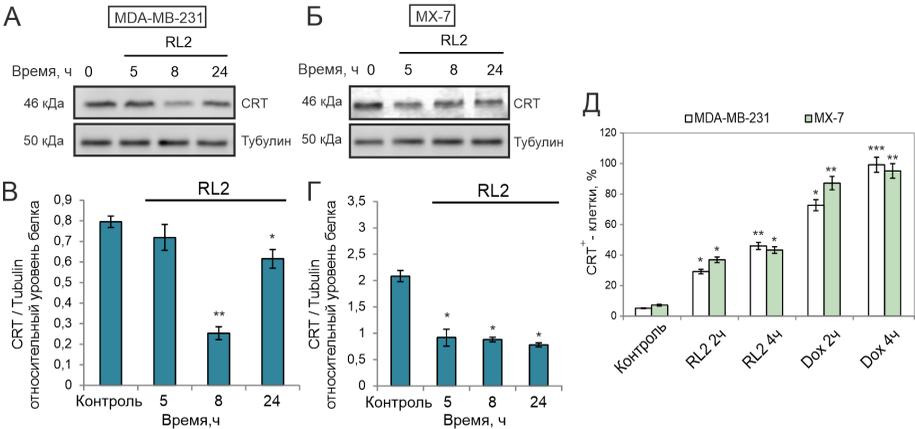


Рис. 1. Относительный уровень общего и поверхностного белка кальретикулина (CRT) в культурах клеток MDA-MB-231 и MX-7, обработанных RL2 или доксорубином (Dox). Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) или Dox (0.2 мкМ) в течение 2-24 ч. **А, Б.** Репрезентативные изображения Вестерн-блот анализа лизатов клеток MDA-MB-231 (**А**) и MX-7 (**Б**), обработанных RL2. **В, Г.** Денситометрический анализ данных Вестерн-блотов лизатов клеток MDA-MB-231 (**В**) и MX-7 (**Г**). Данные представлены как относительное среднее значение \pm SD, нормализованное к уровню β -тубулина. **Д.** Относительное количество CRT⁺-клеток согласно данным проточной цитометрии. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$, *** для $p < 0.001$.

1.1.2. Экспозиция HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану и выход АТФ под действием RL2

RL2-зависимую транслокацию белка теплового шока HSP70 на внешнюю клеточную мембрану оценивали методом проточной цитометрии с применением специфических антител к HSP70. В образцах клеток, инкубированных с RL2, уже через 6 часов инкубации HSP70-позитивные популяции составили 55.1 % для MDA-MB-231 и 80.6 % для клеток MX-7 (Рис. 2А). Инкубация опухолевых клеток с RL2 в течение 4 ч не вызвала достоверного увеличения количества внеклеточного АТФ. Более продолжительная инкубация с RL2 (20-24 ч) вела к достоверному увеличению внеклеточного АТФ для обеих клеточных линий (Рис. 2Б).

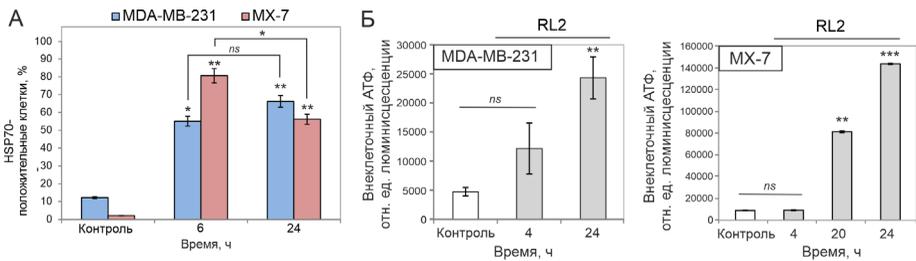


Рис. 2. Экспозиция белка теплового шока HSP70 и относительное количество АТФ в среде при культивировании клеток в присутствии RL2. Клетки MDA-MB-231 и MX-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл) в течение 4-24 ч. **А.** Экспозиция HSP70 под действием RL2. Данные проточной цитометрии представлены как среднее значение количества HSP70-положительных клеток по двум независимым экспериментам \pm SD. **Б.** Относительное количество АТФ в среде при культивировании клеток в присутствии RL2. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$, *** для $p < 0.001$. ns – различия между группами не существенные.

1.1.3. Изменение уровня внеклеточного и клеточного HMGB1 под действием RL2

Динамика изменения содержания HMGB1 в культуральной среде клеток MDA-MB-231 и MX-7 после обработки RL2 показала, что инкубация в течение 3 ч недостаточна для стимуляции выхода HMGB1 из клеток. Более продолжительная инкубация (12-24 ч) с RL2 вызывала увеличение концентрации HMGB1 в культуральной среде в 5-7 раз по сравнению с контрольными необработанными клетками (Рис. 3А,Г).

Анализ общего клеточного HMGB1 методом Вестерн-блота показал снижение внутриклеточного HMGB1: в процессе инкубации с RL2 происходило линейное уменьшение количества внутриклеточного HMGB1 (Рис. 3Б,В,Д,Е).

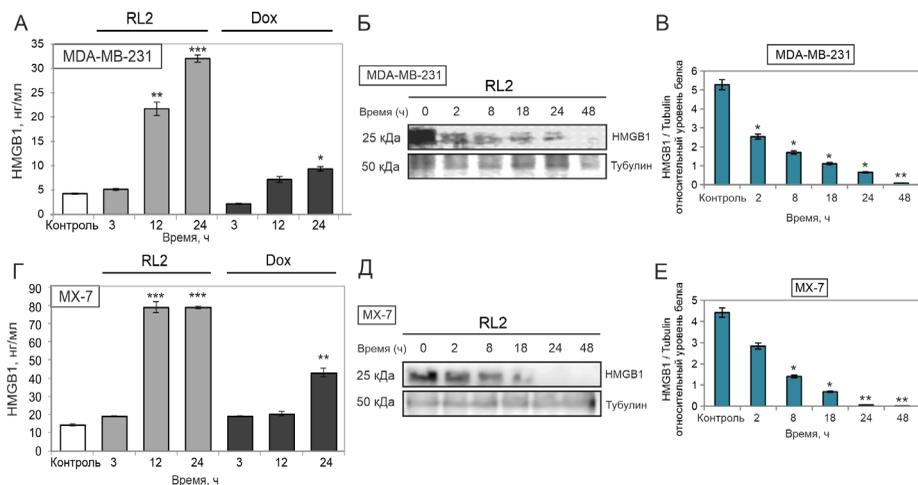


Рис. 3. Изменение уровня HMGB1 под действием RL2. Клетки MDA-MB-231 и MX-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл) или доксорубицином (Dox, 0.2 мкМ) в течение 2-48 ч. **А, Г.** Внеклеточный HMGB1 измеряли в культуральной среде клеток MDA-MB-231 и MX-7, обработанных RL2 и Dox. Культуральную среду от обработанных клеток отбирали и анализировали методом ИФА при помощи набора HMGB1 ELISA KIT. **Б, Д.** Репрезентативные изображения Вестерн-блот анализа лизатов клеток MDA-MB-231 (**Б**) и MX-7 (**Д**), обработанных RL2 в течение 2-48 ч. В качестве контроля использовали β -тубулин. **В, Е.** Денситометрический анализ данных Вестерн-блотов. Данные представлены как относительное среднее значение \pm SD, нормализованное к уровню β -тубулина. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$.

Таким образом, показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывает активацию основных маркеров, позволяющих говорить о иммуногенном типе клеточной гибели: транслокацию кальретикулина (CRT) и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану, выход АТФ и HMGB1 во внеклеточное пространство.

1.2. Исследование эффекта вакцинации клетками, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2, in vivo

Клетки, погибающие с активацией маркеров иммуногенной гибели, должны вызывать эффект противоопухолевой вакцинации с развитием специфического противоопухолевого иммунного ответа. Поскольку было обнаружено, что препарат RL2 вызывает в клетках активацию маркеров ICD в культуре, важно было исследовать вакцинирующий эффект опухолевых клеток, предварительно обработанных RL2. Эксперименты проводили согласно стандартной схеме, которая рекомендована для исследования эффекта вакцинации (Kerr, et al., 2020). Для анализа вакцинирующего эффекта трансплантации опухолевых клеток MX-7, обработанных RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), клетки были трансплантированы подкожно мышам СЗН/Не. Контрольным мышам вводили

живые клетки MX-7. Животных, которым трансплантировали клетки, обработанные доксорубицином (0.2 мкМ, 24 ч), использовали в качестве положительного контроля. Через 8 дней после трансплантации погибающих клеток, всем мышам трансплантировали живые клетки MX-7 в противоположный бок (Рис. 4А). Было обнаружено, что к 70-му дню после первой трансплантации выживаемость мышей в группе RL2 составила 70%, в группе Dox все мыши были живы (Рис. 4Б). У 50% мышей в обеих экспериментальных группах – RL2 и Dox, не было обнаружено опухолей в месте трансплантации живых опухолевых клеток (Рис. 4В). Таким образом, трансплантация опухолевых клеток MX-7, погибающих под действием RL2 и Dox, вызывает иммунизацию, и мыши, которым трансплантировали обработанные клетки, были частично защищены от роста опухолевого узла, сформированного повторной трансплантацией опухолевых клеток.

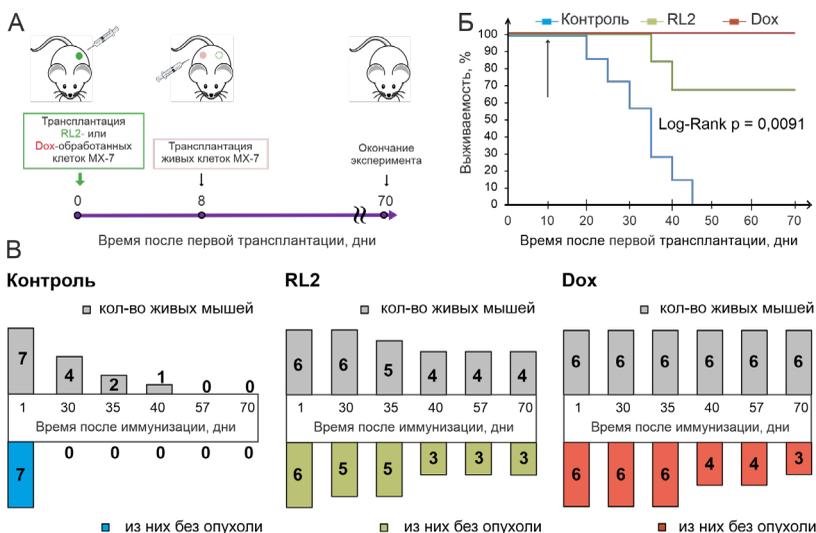


Рис. 4. Оценка эффекта вакцинации мышей СЗН/Не клетками MX-7, обработанными RL2 (0.3 мг/мл) или доксорубицином (Dox, 0.2 мкМ) в течение 24 ч. **А.** Схема иммунизации. **Б.** Количество живых мышей и мышей без опухолей в группах в динамике. **В.** Продолжительность жизни вакцинированных мышей. Различия между группами рассчитаны с использованием непараметрической статистики, критерия хи-квадрат Пирсона, достоверно при $p < 0.05$. Кривые выживаемости Каплана-Майера и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prizm (Сан-Диего, США).

1.2.1. Оценка эффекта вакцинации при трансплантации клеток MX-7, обработанных RL2, в состоянии позднего апоптоза/некроза

Противоопухолевую вакцинацию можно осуществлять как суммарным пулом обработанных клеток, так и частью клеток, в которых подтверждено

состояние гибели. Для оценки вклада некротической популяции клеток в индукцию иммуногенной клеточной гибели, клетки МХ-7 *in vitro* инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 24 ч и, далее, методом проточной сортировки FACS, отбирали популяцию клеток, положительных по йодиду пропидия (PI⁺-клетки). Аналогично предыдущему эксперименту, PI⁺-клетки трансплантировали мышам СЗН/Не и через 7 дней проводили повторную трансплантацию живых клеток МХ-7. Через 25 дней после повторной трансплантации живых клеток, в группе RL2 у 3х из 8 мышей не развилась опухоль (Рис. 5).

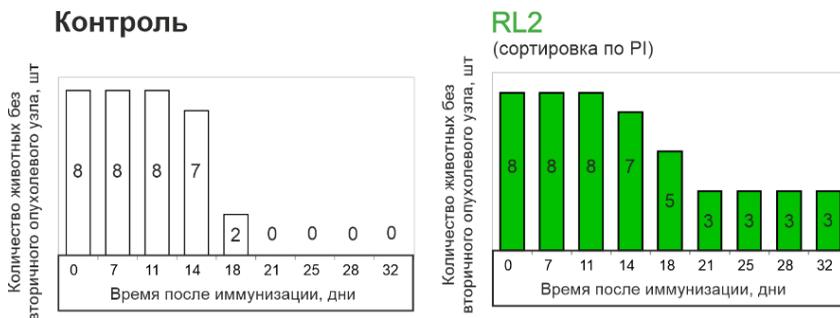


Рис. 5. Оценка эффективности противоопухолевой вакцинации мышей СЗН/Не клетками МХ-7 в состоянии позднего апоптоза/некроза, индуцированного обработкой RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч). Показана динамика появления опухолевого узла экспериментальных животных в сайте второй трансплантации (живых опухолевых клеток). Различия между группами рассчитаны с использованием непараметрической статистики, критерия хи-квадрат Пирсона, достоверно при $p < 0.05$.

Таким образом, было установлено, что эффект вакцинации при иммунизации клетками, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2 в состоянии позднего апоптоза/некроза (PI⁺-популяция), составил 37%. По сравнению с эффектами вакцинации суммарным пулом RL2-обработанных клеток эффект вакцинации был ниже (37% против 50%).

1.2.2. Влияние этилпирувата, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО), на эффективность вакцинации RL2-обработанными клетками

Ферменты, участвующие в метаболических процессах в клетках опухоли и её микроокружении, такие как индоламин 2,3-диоксигеназа (ИДО), могут регулировать иммуносупрессию. Повышенная экспрессия ИДО снижает количество триптофана и приводит к накоплению кинуренина и его метаболитов, которые блокируют пролиферацию Т-лимфоцитов, одновременно стимулируя регуляторные Т-клетки, негативно влияющие на развитие иммунной реакции. В данном исследовании было проанализировано, может ли ингибирование ИДО усилить эффект противоопухолевой вакцинации клетками, обработанными RL2. Для этого мыши, которым трансплантировали

клетки, обработанные RL2 (0.3 мг/мл), до момента второй трансплантации живых опухолевых клеток, дополнительно получали курс инъекций этилпирувата (ЭП), ингибитора ИДО. Сравнение опухолеобразования показало, что две из пяти мышей в группе RL2 были без опухоли, в группе RL2/ЭП – три из пяти, в контрольной группе опухоли развились у всех пяти мышей (Рис. 7А). Несмотря на то, что различия в количестве мышей без опухолей для RL2 и RL2/ЭП статистически недостоверны, средний размер опухолей в группе RL2/ЭП был наименьшим и был примерно в четыре раза ниже, чем в контрольной группе (Рис. 7В). Таким образом, этилпируват оказывал положительное влияние на противоопухолевый вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток.

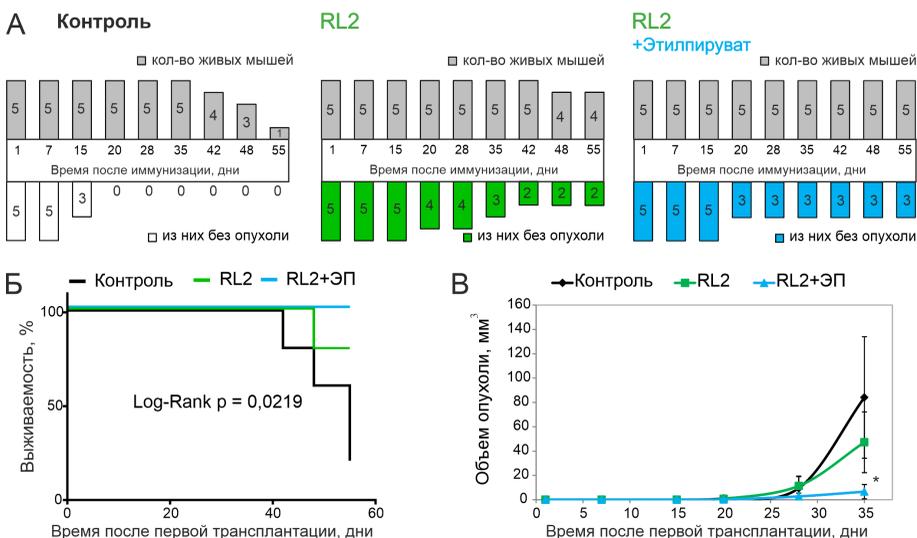


Рис. 6. Этилпируват (ЭП) (40 мг/кг) усиливает эффективность противоопухолевой вакцинации клетками MX-7, обработанными RL2 (0.3 мг/мл). **А** Динамика количества живых мышей в группах и мышей без опухолей. **Б.** Выживаемость вакцинированных мышей. **В.** Динамика роста второго опухолевого узла. Различия между группами по количеству мышей без опухолей были рассчитаны с использованием непараметрической статистики критерия хи-квадрат Пирсона, достоверно при $p < 0.05$. Кривые выживаемости Каплана-Майера и статистику Log-Rank рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prizm (Сан-Диего, США).

По результатам независимых экспериментов по трансплантации суммарного пула клеток, погибающих под действием RL2, вакцинирующий противоопухолевый эффект в среднем развился у 43.3% вакцинированных мышей. Этилпируват усиливал вакцинирующий противоопухолевый эффект в среднем до 60%.

2. Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующий GM-CSF человека и лактапгин

2.1. Анализ активации маркеров иммуногенной гибели опухолевых клеток, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины

Для исследования индукции иммуногенной клеточной гибели рекомбинантными вирусами осповакцины (BOB): VV-GMCSF-Lact, VV-GMCSF-Apo и VV-GMCSF-dGF, опухолевые клетки MDA-MB-231 и MX-7 заражали рекомбинантными вирусами и затем в них анализировали изменения количества и локализации характерных молекулярных маркеров ICD: кальретикулина, HSP70, АТФ и HMGB1.

2.1.1. Исследование экспозиции кальретикулина на внешнюю плазматическую мембрану под действием рекомбинантных вирусов осповакцины

Клетки MDA-MB-231 и MX-7 заражали рекомбинантными BOB со множественностью инфекции 0.5 и 0.05 БОЕ/клетку и анализировали изменение поверхностного CRT через 24-48 ч после заражения. Можно видеть, что все рекомбинантные вирусы вызывают транслокацию CRT на внешнюю мембрану клетки (Рис. 7) вне зависимости от экспрессии апоптоз-индуцирующих белков.

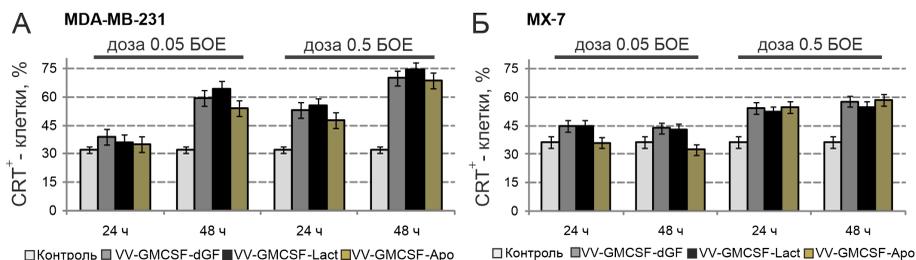


Рис. 7. Изменение уровня CRT в опухолевых клетках MDA-MB-231 (А) и MX-7 (Б), зараженных рекомбинантными BOB: VV-GMCSF-dGF, VV-GMCSF-Lact и VV-GMCSF-Apo через 48 ч инкубации. Гистограммы распределения CRT-положительных клеток после обработки вирусами (множественность инфекции: 0.05 и 0.5 БОЕ/клетку), относительно контрольных необработанных клеток.

2.1.2. Экспозиция HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием рекомбинантных вирусов осповакцины

Для анализа транслокации белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану клеток, клетки MDA-MB-231 заражали рекомбинантными BOB и анализировали методом проточной цитометрии. Экспозиция HSP70 была детектирована только при высокой дозе вирусной нагрузки – множественности инфекции 0.5 БОЕ/клетку (Рис. 8). Можно видеть, что инфицирование всеми тремя рекомбинантными вирусами вызывает

экспозицию HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану через 24 ч вирусной инфекции с равной эффективностью для всех ВОВ.

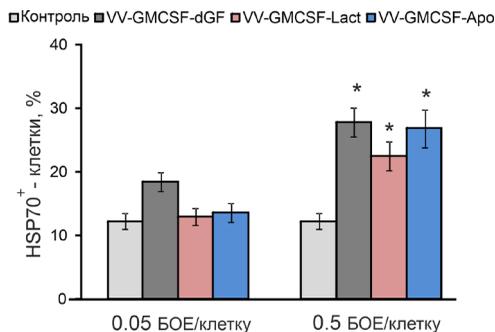


Рис. 8. Изменение экспозиции белка HSP70 на внешней плазматической мембране в опухолевых клетках MDA-MB-231. Гистограммы распределения HSP70-положительных клеток после обработки вирусами (0.05 и 0.5 БОЕ/клетку), относительно контрольных необработанных клеток. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$.

2.1.3. Изменение уровня внеклеточного АТФ при инфекции рекомбинантными вирусами осповакцины

Заражение рекомбинантными вирусами осповакцины клеток MDA-MB-231 вело к увеличению уровня внеклеточного АТФ в культуральной среде (Рис. 9) только после продолжительной вирусной инфекции. Уровень АТФ в образцах через 44 ч возрастал в ряду образцов клеток, инфицированных вирусами VV-GMCSF-Lact < VV-GMCSF-Apo < VV-GMCSF-dGF. Поздний выход АТФ связан с особенностями гибели клеток, зараженных ВОВ, поскольку гибель клеток происходит через ~72 ч инфекции, после достаточной репликации вирусных частиц (Veyer D. et al, 2017).

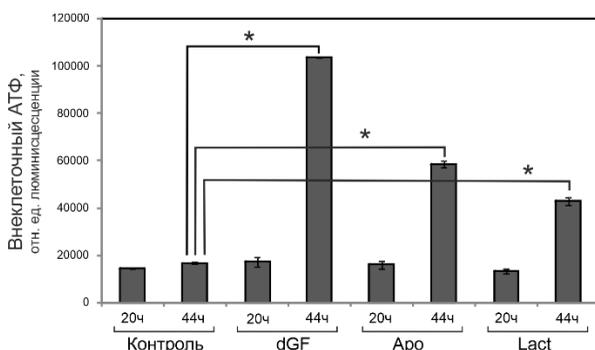


Рис. 9. Относительное количество АТФ в культуральной среде клеток MDA-MB-231, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины: VV-GMCSF-dGF, VV-GMCSF-Apo, VV-GMCSF-Lact. Анализ проводили через 20 и 44 ч после заражения вирусами (0.05 БОЕ/клетку). Статистические различия между контрольными и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$.

2.1.4. Изменение клеточного HMGB1 под действием рекомбинантных вирусов осповакцины

Для исследования изменения HMGB1, клетки MDA-MB-231 инкубировали с тремя рекомбинантными ВОВ в течение 3-48 ч, после чего клетки лизировали и анализировали белковый состав образцов методом Вестерн-блота с

применением антител к HMGB1. Можно видеть, что под действием рекомбинантных ВОВ суммарное содержание клеточного HMGB1 через 24 ч и 48 ч уменьшается относительно его уровня в контрольных незараженных клетках. Наиболее вероятно, что снижение клеточного HMGB1 происходит за счет его выхода во внеклеточное пространство, что является маркером ICD.

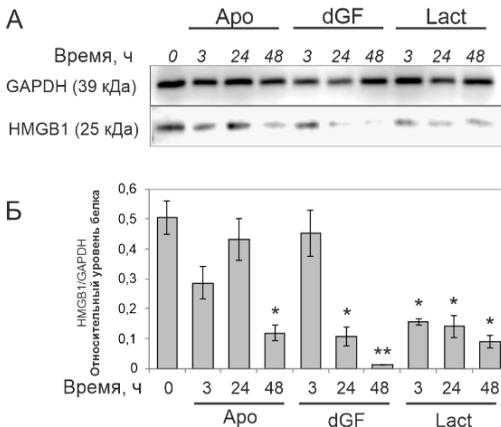


Рис. 10. Изменение HMGB1 в клетках MDA-MB-231, зараженных рекомбинантными вирусами осповакцины VV-GMCSF-dGF, VV-GMCSF-Apo, VV-GMCSF-Lact через 3-48 ч после обработки (0.05 БОЕ/клетку). **А.** Репрезентативные изображения Вестерн-блот анализа лизатов MDA-MB-231, зараженных вирусами осповакцины **Б.** Денситометрический анализ данных Вестерн-блотов. Данные представлены как относительное среднее значение \pm SD, нормализованное к уровню GAPDH. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$; ** для $p < 0.01$.

Можно заключить, что эффективность активации всех исследованных маркеров ICD не зависела от продукции апоптоз-индуцирующих белков рекомбинантными ВОВ. Наиболее вероятно, что активация маркеров ICD происходит как общий ответ на вирусную инфекцию, маркирующий зараженную клетку к захвату фагоцитирующими клетками.

2.2. Исследование эффекта вакцинации клетками, зараженными рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact, in vivo

Для анализа вакцинирующего эффекта опухолевых клеток MX-7, зараженных рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч), инфицированные клетки были трансплантированы подкожно мышам СЗН/Не аналогично эксперименту с рекомбинантным аналогом лактапина RL2. Через 7 дней после иммунизации, всем мышам трансплантировали живые клетки MX-7 в противоположный бок. Было обнаружено, что к 111-му дню иммунизации только у двух из 10 мышей в группе с ВОВ не было опухолей в месте трансплантации живых опухолевых клеток (Рис. 11). Различия между экспериментальной и контрольной группами были недостоверными. Выживаемость мышей в группе ВОВ составила 30% (Рис. 11).

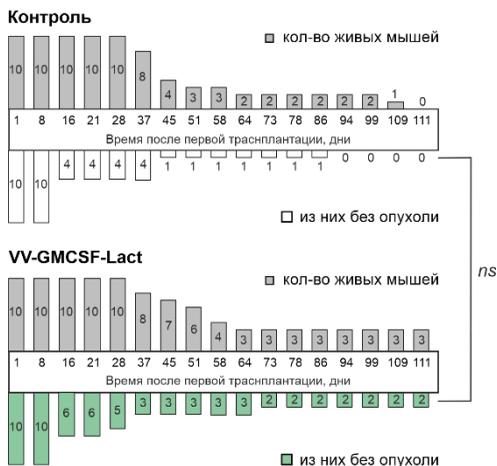


Рис. 11. Иммунизация мышей СЗН/Не клетками MX-7, обработанными рекомбинантным вирусом осповакцины VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку). Количество живых мышей и мышей без опухолей в группах в динамике. Различия между группами по количеству мышей без опухоли были рассчитаны с использованием непараметрической статистики критерия хи-квадрат Пирсона. ns – различия между группами не существенные.

Таким образом, несмотря на активацию маркеров ICD под действием рекомбинантного вируса VV-GMCSF-Lact *in vitro*, мыши, иммунизированные клетками MX-7, зараженными рекомбинантным ВОВ, не были защищены от роста опухолевого узла, инициированного повторной трансплантацией живых опухолевых клеток.

3. Холодная плазменная струя (ХПС)

Одним из новых перспективных направлений в лечении злокачественных образований является холодная плазменная струя (ХПС) (Lin. A. et al, 2018). ХПС 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 данном исследовании анализировали цитотоксическую активность ХПС в отношении опухолевых клеток мыши MX-7 (Рис 12). Клетки MX-7 подвергали прямому облучению ХПС в течение 5-60 сек (амплитуда тока 7 мА, скорость потока гелия 9 л/мин, напряжение 4.9 кВ), после чего клетки культивировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Анализ жизнеспособности клеток методом МТТ показал, что наибольшее снижение жизнеспособности клеток MX-7 достигался после 60 сек прямого облучения (Рис. 12А). На рисунке 12Б можно видеть, что при длительном облучении клеток ХПС (2 и 4 мин), клетки погибают почти сразу после облучения, что можно интерпретировать как неспецифическую цитотоксическую активность ХПС при указанных параметрах (Рис. 12Б). Полученные результаты позволили выбрать обработку продолжительностью 1 мин при указанных параметрах струи в качестве оптимальных условий облучения для последующих экспериментов.

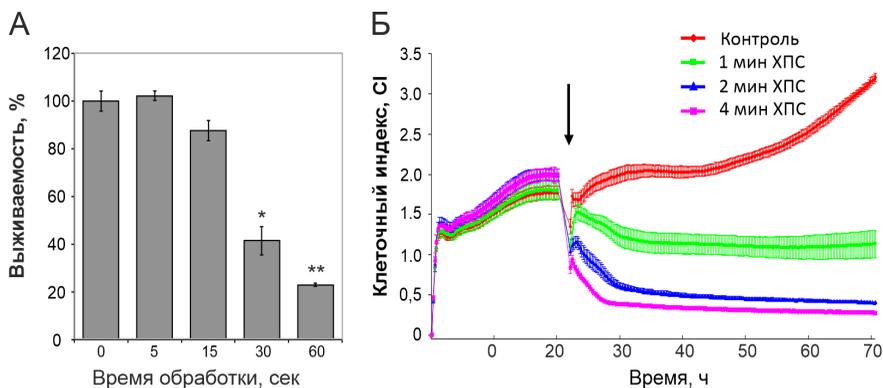


Рис. 12. Оценка цитотоксической активности холодной плазменной струи (ХПС) в отношении клеток MX-7. **А.** Клетки MX-7 облучали ХПС в течение 5-60 сек в 96-луночном планшете (гелий 9 л/мин, 4,9 кВ). Анализ жизнеспособности клеток (МТТ-тест) проводили через 24 ч после обработки ХПС. Данные представлены в виде доли от необработанных клеток (100%). Статистические различия между контрольной (0) и экспериментальной группами обозначены: * для $p < 0.05$, ** для $p < 0.01$. **Б.** Динамика роста клеток MX-7, обработанных ХПС в течение 1-4 мин, в режиме реального времени на приборе iCELLigence. Черная стрелка указывает момент облучения клеток ХПС.

3.1. Экспозиция CRT и HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану под действием ХПС

Транслокацию кальретикулина и HSP70 в клетках рабдомиосаркомы мыши MX-7 детектировали с помощью иммуноцитометрического анализа через 24 ч после обработки ХПС. В образцах появилась популяция клеток с экспонированным кальретикулином – около 25% клеток имели на своей поверхности CRT (Рис. 13А). Экспозицию белка теплового шока HSP70 также оценивали через 24 ч после облучения. Было обнаружено, что 39% клеток становятся HSP70-положительными (Рис. 13Б).

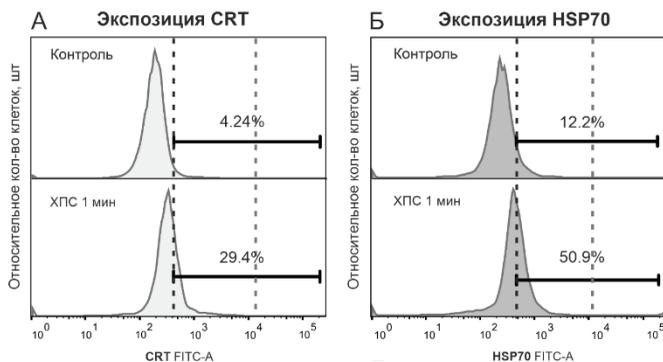


Рис. 13. Транслокация CRT (**А**) и HSP70 (**Б**) в клетках после облучения ХПС. Клетки MX-7 облучали ХПС в течение 1 мин (гелий 9 л/мин, 4,9 кВ) и оценивали поверхностный CRT и HSP70 через 24 ч методом проточной цитометрии.

3.2. Изменение уровня внеклеточного и клеточного HMGB1 под действием ХПС

Для оценки уровня внеклеточного HMGB1, клетки MX-7 облучали ХПС в течение 1 мин и культивировали в стандартных условиях, отбирая аликваты культуральной среды для определения концентрации HMGB1 методом ИФА. Увеличение концентрации HMGB1 в культуральной среде было обнаружено уже через 24 ч после облучения ХПС (Рис. 14).

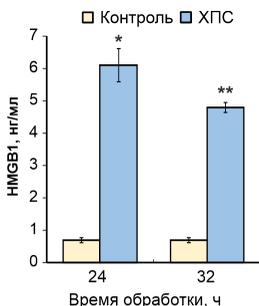


Рис. 14. Анализ внеклеточного HMGB1 в культуральной среде клеток MX-7, облученных ХПС. Клетки MX-7 подвергали воздействию ХПС в течение 1 мин (гелий 9 л/мин, 4,9 кВ), HMGB1 анализировали в культуральной среде методом ИФА через 24 и 32 ч. Статистические различия между контрольной и экспериментальной группами обозначены: * для $p < 0.05$, ** для $p < 0.01$.

3.3. Изменение уровня HMGB1 в сыворотке крови мышей, облученных ХПС

Теоретически, HMGB1 из погибающих клеток может распространяться локально в опухолевом окружении, попадать в кровотоки и оказывать влияние на клетки иммунной системы. Мы предположили, что ХПС-зависимое высвобождение HMGB1 из погибающих опухолевых клеток может изменять уровень HMGB1 в сыворотке крови мышей с опухолью, облученных ХПС. Мышей СЗН/Не с трансплантированной опухолью MX-7 и здоровых мышей облучали ХПС в течение 1 минуты дважды, с интервалом 24 ч. Кровь для приготовления сыворотки собирали через 1 и 24 ч после второго облучения ХПС.

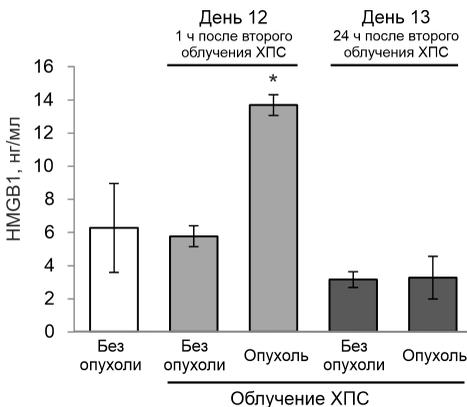


Рис. 15. Влияние облучения ХПС на уровень HMGB1 в сыворотке крови здоровых мышей СЗН/Не и мышей СЗН/Не с опухолями рабдомиосаркомы MX-7. Мышей дважды облучали ХПС (гелий 9 л/мин, 4,9 кВ) в течение 1 мин дважды, с интервалом 24 ч. Кровь мышей собирали через 1 и 24 ч после второго облучения ХПС. Уровень HMGB1 в сыворотке мышей оценивали методом ИФА. Без опухоли – здоровые мыши, Опухоль – мыши с опухолью MX-7. Данные представлены как среднее значение \pm SD ($n=5$). Различия рассчитывались с использованием t-критерия Стьюдента, разница между группами была статистически значимой при $p < 0.05$ (*).

Анализ сыворотки крови мышей показал, что облучение ХПС вызывало двукратное увеличение концентрации НМGB1 через 1 ч после второго воздействия ХПС в сыворотке крови мышей с опухолью (Рис. 15). Через 24 ч происходит снижение уровня НМGB1 в сыворотке крови до уровня НМGB1 контрольных животных без опухоли и без облучения.

Таким образом, отмеченное повышение уровня НМGB1 в сыворотке у мышей-опухоленосителей после облучения может быть следствием высвобождения НМGB1 в кровотоке из клеток, погибающих по пути ICD после облучения.

4. Оценка иммунологических эффектов, вызываемых потенциальными исследуемыми индукторами иммуногенной клеточной гибели

4.1. Выход ИФНа в межклеточное пространство

Помимо указанных основных маркеров ICD было показано, что выход интерферона 1 типа из обработанных клеток важен для эффективного захвата опухолевых антигенов дендритными клетками. При индукции ICD интерферон альфа (ИФНа), выходящий из погибающих клеток, способствует созреванию антигенпрезентирующих клеток, кросс-презентации опухолевых антигенов и привлечению Т-клеток (Galluzzi L. et al., 2020). Концентрацию ИФНа измеряли в культуральной среде клеток MX-7, обработанных RL2 (0.3 мг/мл), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку) или холодной плазменной струей (1 мин). Культуральную среду собирали после обработки через 12 ч (RL2), 48 ч (ВОВ) и 24 ч (ХПС) и анализировали методом ИФА. Анализ ИФНа обработанных клеток показал, что RL2 и VV-GMCSF-Lact вызвали достоверное увеличение концентрации интерферона альфа в культуральной среде до 140 пг/мл и 80 пг/мл, соответственно (Рис. 16).

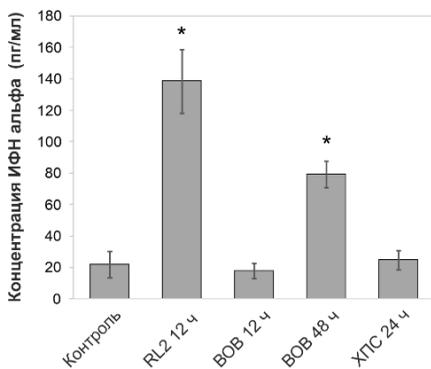


Рис. 16. Изменение уровня внеклеточного интерферона альфа (ИФН) под действием RL2, VV-GMCSF-Lact (ВОВ) и ХПС. Клетки MX-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 12 ч), ВОВ (0.5 БОЕ/клетку, 12 ч и 48 ч) или ХПС (1 мин, гелий 9 л/мин, 4.9 кВ; 24 ч после облучения). Аликвоты культуральной среды от обработанных клеток анализировали методом ИФА при помощи набора IFN alpha Mouse ELISA Kit. Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для $p < 0.05$.

Облучение клеток холодной плазменной струей не вело к дополнительному выходу интерферона из обработанных клеток относительно контрольных клеток. По уровню интерфероновой секреции наиболее существенный

клеточный ответ происходит в результате обработки RL2, что может вносить вклад в формирование наблюдаемого вакцинирующего эффекта RL2-обработанных клеток *in vivo*.

4.2. Стимуляция созревания дендритных клеток красного костного мозга мыши после фагоцитоза опухолевых клеток, обработанных индукторами ICD

Эффективное поглощение погибающих опухолевых клеток дендритными клетками, а также последующее их созревание необходимо для запуска Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа (Lamberti M. et al., 2020).

Дендритные клетки красного костного мозга мышей СЗН/Не (Cell Tracker Green) инкубировали с погибающими клетками MX-7 (Cell Tracker Red) в течение 3 ч и анализировали методом проточной цитометрии, оценивая долю дважды-положительных клеток (Рис. 17). Можно видеть, что наибольшая популяция дендритных клеток, захвативших опухолевые клетки или их фрагменты, была обнаружена в образцах с RL2-обработанными клетками MX-7 (Рис. 17Б).

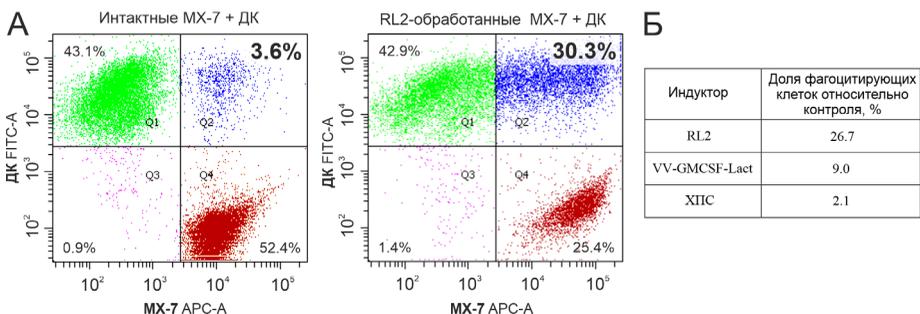


Рис. 17. Фагоцитоз клеток MX-7 незрелыми дендритными клетками (ДК) красного костного мозга мышей СЗН/Не. Клетки MX-7, меченные красным флуоресцентным красителем Cell Tracker Red (5 мкМ), обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч), ХПС (1 мин, гелий 9 л/мин, 4.9 кВ; 24 ч после облучения), после чего инкубировали 3 ч совместно с дендритными клетками из красного костного мозга мышей СЗН/Не, меченными зеленым флуоресцентным красителем Cell Tracker Green (1 мкМ). **А.** Репрезентативные изображения цитометрического анализа образцов с RL2-обработанными клетками. Квадрант Q2 соответствует дважды положительной зелено/красной популяции (фагоцитоз). **Б.** Сравнение фагоцитирующей активности ДК мышей СЗН/Не по отношению к клеткам MX-7, обработанным исследуемыми индукторами ICD.

Для оценки стимуляции созревания дендритных клеток незрелые дендритные клетки красного костного мозга мышей инкубировали в течение 18 ч с клетками MX-7, обработанными индукторами ICD, как описано выше для экспериментов по исследованию фагоцитирующей активности ДК. После инкубации образцы клеток окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к антигенам CD11c для выделения популяции дендритных клеток и МНС II, и

анализировали методом проточной цитометрии. Доля МНС II-положительных клеток была наибольшей в образцах дендритных клеток, инкубированных с клетками MX-7, обработанными рекомбинантным аналогом лактапина RL2, и составляла около 22% (Рис. 18А). В образцах ДК, инкубированных с клетками, облученными холодной плазменной струей, доля МНС II-положительных клеток была около 11%. (Рис. 18Б). Наблюдаемая слабая стимуляция ДК клетками MX-7, инфицированными вирусом VV-GMCSF-Lact, могла быть следствием опосредованного влияния вируса на ДК. Известно, что специализированные белки вируса осповакцины способны не только блокировать апоптоз на ранней стадии инфекции, но и тормозить созревание дендритных клеток.

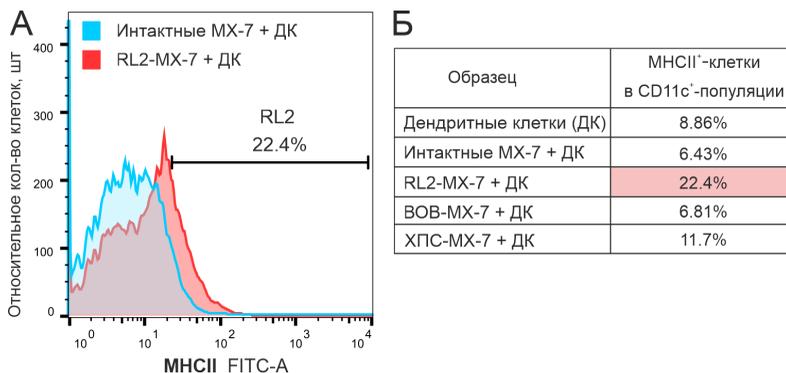


Рис. 18. Оценка созревания дендритных клеток (ДК) красного костного мозга мышей СЗН/Не при инкубации с погибающими опухолевыми клетками MX-7. Клетки MX-7 обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч), ХПС (1 мин, гелий 9 л/мин, 4.9 кВ; 24 ч после облучения), после чего инкубировали 18 ч совместно с ДК мышей СЗН/Не. Образцы окрашивали антителами к CD11c, МНС II и анализировали методом проточной цитометрии. Анализ МНС II⁺-популяций клеток проводили среди CD11c⁺-клеток, соответствующих фенотипу дендритных клеток. **А.** Доля МНС II⁺-популяций клеток от общего количества CD11c⁺-клеток в образце с контрольными и RL2-обработанными клетками. **Б.** Сравнительная таблица доли зрелых ДК (МНС II⁺) в образцах после активации гибнущими клетками.

4.4. Захват опухолевых клеток, обработанных потенциальными индукторами ICD, клетками селезенки мышей *in vivo*

Поглощение дендритными клетками погибающих опухолевых клеток также исследовали в модели *in vivo*. Клетки MX-7 (Cell Tracker Red) обрабатывали исследуемыми индукторами иммуногенной гибели, как описано выше в экспериментах по исследованию фагоцитарной активности ДК *in vitro*, вводили мышам внутривенно и через 3 ч анализировали захват опухолевых клеток дендритными клетками селезенки. Из извлеченных селезенок готовили клеточную суспензию и проводили реакцию иммуноокрашивания, используя флуоресцентно-меченные антитела к антигену CD11c для визуализации ДК.

При анализе полученных образцов методом проточной цитометрии выделяли популяцию CD11c⁺-клеток, среди которых определяли долю клеток с красным флуоресцентным сигналом, соответствующему поглощенным клеткам MX-7 (Рис. 19). Можно видеть, что среди CD11c⁺ ДК селезенки мышей, только в образцах селезенки животных, получивших инъекции RL2-обработанных клеток, достоверно увеличивается популяция, соответствующая популяции дендритных клеток, захвативших RL2-обработанные клетки (Рис. 19). В образцах клеток селезенки мышей, которым вводили клетки, зараженные VV-GMCSF-Lact или облученные ХПС, не происходит изменения данной популяции относительно контрольных клеток (Рис. 19).

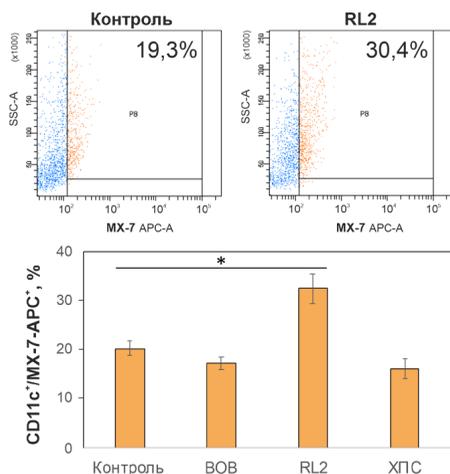


Рис. 19. Захват опухолевых клеток MX-7 CD11c⁺-клетками селезенки мышей *in vivo*. Клетки MX-7 окрашивали Cell Tracker Red (5 мкМ), затем обрабатывали RL2 (0.3 мг/мл, 24 ч), VV-GMCSF-Lact (0.5 БОЕ/клетку, 48 ч) или облучали ХПС (1 мин, 24 ч после облучения), после чего внутривенно вводили мышам СЗН/Не. Через 3 ч селезенки извлекали, измельчали, окрашивали антителами к CD11c-PE и анализировали методом проточной цитометрии. Доля APC⁺-клеток представлена от общего количества CD11c⁺-клеток в образцах. Данные представлены как среднее значение ± SD (n = 4). Статистические различия между контрольной и экспериментальными группами обозначены * для p < 0.05.

Заключение

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что среди исследуемых индукторов клеточной гибели именно RL2 вызывает наиболее существенные изменения, ведущие к созреванию дендритных клеток и презентации опухолевых антигенов Т-клеткам: активизирует маркеры иммуногенной клеточной гибели *in vitro*, усиливает выход интерферона альфа из погибающих клеток, стимулирует активный фагоцитоз погибающих клеток антигенпрезентирующими клетками *in vitro* и *in vivo*, стимулирует формирование комплекса МНС II на поверхности клетки. В совокупности с данными о вакцинирующем эффекте клеток, обработанных RL2, можно заключить, что такие клетки стимулируют адаптивный иммунитет против опухолевых антигенов, а RL2 можно считать перспективным препаратом для комбинированной химиотерапии.

ВЫВОДЫ

1. В обработанных опухолевых клетках рекомбинантный аналог лактапина RL2, рекомбинантный вирус VV-GMCSF-Lact и холодная плазменная струя вызывают активацию маркеров, характерных для иммуногенного типа гибели (ICD), в экспериментах *in vitro*: экспозицию кальретикулина и HSP70 на внешней плазматической мембране, увеличение концентрации внеклеточного АТФ, негистонового ядерного белка HMGB1 и ИФНа. Эффективность активации маркеров ICD в используемых условиях снижается в ряду RL2 > VV-GMCSF-Lact > холодная плазменная струя.
2. Продукция трансгенов цитотоксических белков лактапина или апоптина рекомбинантными вирусами осповакцины не влияет на способность вируса активировать маркеры ICD в зараженных клетках.
3. Эффект противоопухолевой вакцинации погибающими опухолевыми клетками был показан для клеток, обработанных RL2. Ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы этилпириват усиливает противоопухолевый вакцинирующий эффект RL2-обработанных клеток с 43% до 60%. Опухолевые клетки, зараженные рекомбинантным вирусом VV-GMCSF-Lact, не оказывают противоопухолевого вакцинирующего эффекта при трансплантации мышам.
4. Облучение зоны опухоли у мышей холодной плазменной струей ведет к двукратному повышению концентрации маркера иммуногенной клеточной гибели HMGB1 в сыворотке крови.
5. Сравнение индукторов клеточной гибели показало, что опухолевые клетки, гибель которых индуцирована рекомбинантным аналогом лактапина RL2, наиболее эффективно поглощаются антигенпрезентирующими клетками *in vitro* и *in vivo* и стимулируют созревание дендритных клеток.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. 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. – doi: 10.1155/2017/3620510.
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. – doi:10.3390/molecules25122804.
3. **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. // *IJMS.* – 2020. – V. 21. – P. 5128. – doi: 10.3390/ijms21145128.
4. **Троицкая О.С.**, Новак Д.Д., Рихтер В.А., Коваль О.А. Иммуногенная гибель опухолевых клеток в терапии онкологических заболеваний // *ActaNaturae.* – 2022. – Т. 14. – № 1 – С. 40-53. – doi: 10.32607/actanaturae.11523.

Подписано в печать 31.05.2022 г. Печать офсетная.
Бумага офсетная. Формат 60x84, 1/16 усл.печ.л. 1,3л
Тираж 120 экз. Заказ № 751

Отпечатано в типографии «АЛЕКСПРЕСС»
ИП Малыгин Алексей Михайлович
630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 6/1, оф.104
Тел. (383) 217-43-46