

БАБАЕВА ФАТИМА ЭЛЬШАНОВНА

**Клинико-лабораторная характеристика В-клеточных
лимфопролиферативных заболеваний в отношении чувствительности к
онколитическим вирусам**

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор, член-корреспондент РАН

Чумаков Петр Михайлович

кандидат медицинских наук, доцент

Кравченко Сергей Кириллович

Официальные оппоненты:

Никитин Евгений Александрович - доктор медицинских наук, заведующий дневным стационаром гематологии Московского городского гематологического центра Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница имени С.П. Боткина» Департамента здравоохранения Москвы

Кочнева Галина Вадимовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация: «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена» – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва.

Защита состоится « » 2021 года в _____ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125176, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте blood.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным ВОЗ онкологические заболевания остаются в группе основных причин смертности. Несмотря на значительные успехи в лечении опухолей лимфатической системы, разработку наряду с химиотерапевтическими средствами широкого спектра таргетных препаратов, вопросы повышения эффективности терапии индолентных и агрессивных лимфом, проблемы развития рецидивов и лекарственной резистентности остаются актуальными.

Терапия онколитическими вирусами - новое направление в онкологии вышло за рамки клинических испытаний. Так, в 2015 году FDA одобрило талимоген (T-Vec) - первый в мире генно-инженерный онколитический вирус герпеса для иммунотерапии меланомы. В настоящее время за рубежом проводят 78 клинических испытаний различных онколитических вирусов в лечении солидных опухолей.

Вирусы Коксаки А21, везикулярного стоматита, вирус кори изучаются на доклинических моделях множественной миеломы, вирус миксомы и вирус везикулярного стоматита в опухолевых клетках острого миелобластного лейкоза.

Эффективность применения онколитических вирусов в лечении агрессивных и индолентных лимфом практически не изучена, и крайне важным первым шагом в этом направлении является оценка онколитической активности вирусов в первичных культурах клеток.

Степень разработанности темы диссертации

В отечественной и зарубежной литературе представлены работы по изучению онколитических вирусов различных семейств, большинство из которых рекомбинантные аттенуированные вакцинные штаммы. Основная часть исследований направлена на изучение и оценку онколитических свойств непатогенных штаммов онколитических вирусов при лечении солидных опухолей. Потенциал применения непатогенных штаммов вирусов в терапии опухолей лимфатической системы неизвестен.

Проведение исследований на краткосрочных лимфоидных культурах, полученных от пациентов с В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями и проведение

скрининга панели онколитических штаммов с целью выявления наиболее эффективного, является уникальной работой, аналогов которой в РФ и мире нет.

Поиск новых подходов в терапии резистентных форм лимфопролиферативных заболеваний обуславливают цель и задачи данного диссертационного исследования.

Цель исследования

Изучить чувствительность опухолевых клеток различных видов В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ) к непатогенным штаммам онколитических вирусов и выявить наиболее перспективные штаммы для противоопухолевой терапии.

Задачи исследования

1. Получить краткосрочные культуры клеток В-клеточных лимфатических опухолей (фолликулярной лимфомы всех морфологических типов, лимфомы из клеток маргинальной зоны, волосатоклеточного лейкоза, хронического лимфолейкоза, диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности).
2. Оценить эффективность репродукции непатогенных штаммов онколитических вирусов в краткосрочных культурах клеток лимфом и чувствительность опухолевых клеток к онколитическому воздействию различных вирусных штаммов. На основе полученных данных выявить потенциальную перспективность применения тех или иных вирусов в лечении отдельных форм ЛПЗ.
3. Изучить особенности экспрессии мембранных рецепторов, используемых онколитическими вирусами для проникновения в клетки различных лимфопролиферативных заболеваний (CD46, CD155(PVR), CD55, ICAM-1(CD54), CD160) и сопоставить с репликативной способностью вирусов.
4. Сопоставить клинические особенности В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, лабораторные и инструментальные данные с эффективностью онколиза в культурах клеток.
5. Провести сравнительный анализ репродукции вирусов и данных транскриптомного секвенирования с целью выявления генов и сигнальных путей, ассоциированных с эффективностью вирусной репликации.

Научная новизна исследования

Получен патент на изобретение (№2728266, 28.07.2020) – Способ культивирования клеток злокачественных лимфоидных опухолей. Впервые проведен анализ онколитической активности непатогенных штаммов онколитических вирусов в краткосрочных клеточных культурах различных лимфопролиферативных заболеваний и выявлены штаммы вирусов, наиболее перспективные в плане разработки противоопухолевых препаратов. На основе совместного анализа данных транскриптомного секвенирования и онколитической активности непатогенных штаммов энтеровирусов выявлены ключевые сигнальные пути, задействованные в ходе вирусной репликации.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты работы послужат ступенью для дальнейшего изучения возможности применения непатогенных штаммов онколитических вирусов для лечения лимфом.

Положения, выносимые на защиту

1. Получены краткосрочные клеточные культуры различных В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, на которых проведена оценка потенциальной эффективности применения онколитических вирусов для лечения этих опухолей.
2. Наиболее эффективно реплицируются в опухолевых клетках штаммы ЖЭВ14, ЕСНО12, а также вакцинный штамм полиовируса 1 типа (Сэбин) PV1S, что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для дальнейшей разработки противоопухолевых препаратов.
3. Онколитические вирусы активно реплицируются и вызывают цитолиз в краткосрочных культурах опухолевых клеток, полученных от пациентов с В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями, как чувствительными к химиотерапии, так и резистентными к ней.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность выводов обеспечена скрупулезным изучением источников литературы по теме диссертации, детальной разработкой лабораторной, инструментальной и экспериментальной частей работы с включением в исследование достаточного количества краткосрочных лимфоидных культур для достоверного использования методов статистического анализа. Полученные результаты представлены в виде устных и стендовых докладов, тезисов на конгрессах, съездах и конференциях: FEBS EMBO 2019 Conference (Krakow, Poland, 6-11 July, 2019), «Современная медицина: новые

подходы и актуальные исследования» 25 июня 2019 года, Москва, Babaeva F.E. Evaluation of a panel of non-pathogenic enterovirus strains as potential oncolytic agents for the therapy of malignant lymphomas/ F.E. Babaeva, A.V. Lipatova, D.V. Kochetkov, S.K. Kravchenko, P.M. Chumakov // FEBS EMBO 2019 Conference, Krakow, Poland, 6-11 July, 2019. Оценка онколитических свойств панели непатогенных штаммов энтеровирусов для терапии злокачественных лимфом / Ф.Э.Бабаева, А.В.Липатова, Д.В. Кочетков// Интернаука, июнь 2019 года, Москва, «Омиксный анализ детерминант неходжкинских лимфом для выявления индивидуальных различий заболевания, влияющих на чувствительность к онколитическим вирусам» Ф.Э.Бабаева, А.В.Липатова, Д.В.Кочетков, П.М.Чумаков, С.К. Кравченко// Конгресс гематологов, 16-18 апреля 2020 года, Москва, Babaeva F.E. Simultaneous analysis of oncolytic viruses' reproduction and RNASeq transcriptome data in short-term lymphoid cultures for identification of biomarkers for viral therapy effectiveness prediction/ F.E. Babaeva, A.V. Lipatova, D.V. Kochetkov, S.K. Kravchenko, P.M. Chumakov // Soho Congress, September 9- 12, 2020, Houston, Texas, USA. Бабаева Ф.Э. Совместный анализ репродукции онколитических вирусов и данных транскриптомного секвенирования для идентификации биомаркеров эффективности вирусной терапии/ Ф.Э.Бабаева, А.В.Липатова, Д.В.Кочетков, П.М.Чумаков, С.К. Кравченко// Злокачественные лимфомы 29-30 октября 2020 года, Москва.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 2 статьи, из которых – 2 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, а также 5 тезисных сообщений (3 на русском языке, 2 на английском языке). Получен 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа представлена на 177 страницах и состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов, собственных данных, обсуждения, заключения, выводов и перечня литературы (240 источников). Работа содержит 16 таблиц и 34 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего в исследование включено 54 больных (23 мужчины, 31 женщина), в возрасте от 27 до 77 лет (медиана возраста – 47 лет) консультированных в поликлиническом (заведующий отделением к.м.н. Моисеева Т.Н.), хирургическом (заведующий отделением д.м.н. Данишян К.И.) и клинических отделениях ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России за период с марта 2017 по февраль 2019 гг. В исследование включены все пациенты с впервые установленным диагнозом «неходжкинская лимфома», при этом возраст, шкала соматического статуса не являлись критериями исключения.

Всем пациентам выполнена биопсия опухолевого субстрата и диагноз установлен на основании гистологического и иммуногистохимического, цитогенетического и молекулярно-генетического исследований соответственно. Также с целью оценки объема поражения выполнялись стандартные исследования, рекомендованные при лимфопролиферативных заболеваниях (общий клинический анализ крови, биохимический анализ крови, компьютерная томография, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), ультразвуковое исследование, исследование костного мозга, иммунохимия сыворотки крови и мочи).

В работе использовались следующие штаммы: вирус Коксаки В5, штамм МКВ10 (ЖЭВ-14); вирус Коксаки В6, штамм МКВ11 (ЖЭВ-15); вирус Коксаки А7, штамм МКВ4 (ЖЭВ-8); вирус ЕСНО12, штамм Л0572 МКВ3 (ЖЭВ-7); вирус везикулярного стоматита, штамм Indiana, штамм полиовируса PV1S (Сэбин). Все перечисленные вирусные штаммы были получены из коллекции лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН имени В.А.Энгельгардта.

Морфологическая и клиническая характеристики пациентов приведены в **таблице 1**.

Таблица 1 – Клиническая характеристика пациентов, полученных краткосрочных клеточных линий лимфоидной природы

<i>Название линии и характеристики опухоли</i>	<i>ВклВСЗ</i>	<i>ХЛЛ</i>	<i>ФЛ 1-2</i>	<i>ФЛЗ</i>	<i>ЛКМЗ</i>	<i>ЛБ</i>	<i>ДВККЛ</i>	<i>ВКЛ</i>	<i>МКЛ</i>
<i>Количество образцов</i>	3	4	18	7	9	2	6	1	4
<i>Медиана возраста пациентов (лет)</i>	66,3	62	48,6	48,4	69,7	38	51,1	44	62,7
<i>Стадия</i>									
<i>I</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>II</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>III</i>	1	-	4	2	3	-	2	-	-
<i>IV</i>	2	4	14	4	6	2	4	1	4
<i>Ki-67 10-15%</i>	0	1	11	1	5	0	0	0	0
<i>20-40%</i>	0	3	7	3	4	0	0	1	4
<i>60-80%</i>	3	0	0	3	0	2	6	0	0
<i>ЛДГ > N</i>	3	3	13	5	6	2	4	1	4
<i>ЛДГ НОРМА</i>	1	1	5	2	3	0	2	0	0
<i>Вовлечение костного мозга</i>	1	5	10	2	4	0	1	0	3
<i>Вовлечение селезенки</i>	1	1	5	0	5	0	2	1	1
<i>Лейкоциты: выше нормы</i>	0	3	3	1	0	0	0	0	1
<i>факторы риска по шкалам FLIPI-2/ IPI/MIPi</i>									
<i>низкий</i>	1	0	3	0	0	1	1	0	0
<i>промежуточный</i>	0	3	10	3	7	0	3	1	2
<i>высокий</i>	2	1	5	4	2	1	2	0	2
<i>Средний процент жизнеспособных клеток в культуре (%)</i>	86	84,6	88,7	88,6	92,7	96	87,2	91	85,5

Методика получения краткосрочных лимфоидных культур

Фрагменты опухолевой ткани, полученные во время операций и биопсий, помещали в стерильные пробирки с охлажденной до +4° С средой ДМЕМ (ПанЭко, Россия), содержащей антибиотики стрептомицин (50 мкг/мл) и пенициллин (50 ед/мл) (ПанЭко, Россия). Далее материал хранился при температуре +4° С не более 72 часов. Культуры получали путем фракционирования опухолевого материала с помощью специальных нейлоновых сеточек диаметром отверстий 100 мкм (Cell Strainer, SPL Lifesciences, Корея) и пластикового пестика. Полученный опухолевый субстрат промывался фосфатно-солевым буфером (PBS) в объеме 15 мл. Далее полученный материал наслаивали на раствор фиколла с плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия), в соотношении 10 мл раствора фиколла и 15 мл суспензии, содержащей опухолевые клетки. Центрифугирование проводили в течение 30 минут, со скоростью 650 g, с минимальной скоростью разгона и остановки при температуре 18°С. Субстрат опухолевых клеток промывали PBS, повторно центрифугировали 10 минут, со скоростью 1200 g. Клеточный осадок растворяли в 5-10 мл среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащая 10% бычьей сыворотки, пенициллин и стрептомицин в стандартных концентрациях, после чего инкубировали при 37° С. Предварительно оценивался % процент живых клеток путем подсчета в аппарате Countess automated cell counter при окрашивании трипановым синим при температуре 20°С. При центрифугировании обращало на себя внимание недостаточно оптимальное разделение опухолевых клеток от среды, а также смешивание клеток в промывочной среде, в которой проводилось разделение фракции опухолевого субстрата. Тогда в процессе выделения так называемого «кольца опухолевых клеток» на фиколле, нами была предпринята попытка использовать в практике остановки с минимальной скоростью, так называемое «stop without break», при центрифугировании или остановка без тормоза (~1) и разгон с минимальной акселерацией (~ 0).

Таким образом, были получены краткосрочные суспензионные культуры из лимфоидных опухолей.

Оценка чувствительности опухолевых клеток к непатогенным штаммам онколитических вирусов

Для оценки онколитических свойств вирусов были протестированы полученные нами краткосрочные лимфоидные культуры.

Чувствительность линий опухолевых клеток после заражения штаммами вирусов оценивалась с помощью теста на цитотоксичность (MTS-тест, фотометрический метод), основанный на оценки метаболической активности митохондриальных дегидрогеназ. Каждая краткосрочная культура была рассажена на 96-луночную планшетку в количестве 5 тысяч клеток на лунку в объеме 100 мкл, затем клетки заражали 10-ти кратным серийным разведением вируса (по 4 параллели на каждое разведение). Далее проводилась инкубация при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности в течение 72 часов. Контрольный образец представлял собой среду, не содержащую вирус. После инкубации клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), вносили ростовую среду, содержащую 2% сыворотку (FBS). Планшеты с клетками, зараженными вирусом, культивировали до проведения оценки цитотоксичности при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Таким же способом проводили оценку эффективности репликации вируса в РВМС. Через 72 часа после инфицирования клеток вирусом проводили оценку цитотоксичности с помощью MTS-теста. Сущность теста заключается в способности дегидрогеназ митохондрий метаболически активных клеток превращать MTS-реагент в окрашенные кристаллы формазана. Для проведения данного теста проводили 3-х часовую инкубацию клеток, зараженными вирусными препаратами с 0,5% раствора MTS- реагента. Затем полученные кристаллы формазана растворяли в ДМСО в течение 10 минут и измеряли оптическую плотность раствора, длина волны при этом составляла 540 нм. Выжившие клетки, их количество, рассчитывалось в процентах относительно контроля.

Оценка репликативной способности непатогенных штаммов онколитических вирусов

Оценка репликативной способности вирусов в полученных первичных краткосрочных лимфоидных линиях опухолевых клеток проводилась способом оценки титра вирусной нагрузки в среде, взятой через 72 часа после заражения клеток с MOI=1. Засевание клеток проводилось в 96-луночные планшеты и через 24 часа заражение вирусом. Через 72 часа выполнялся забор полученной среды, а затем приготовление 10-ти кратных разведений, после этого проводилось заражение чувствительной линии клеток RD (рабдомиосаркомы). Каждые 24 часа визуально оценивали культуры клеток, выявляя изменения и фиксируя микроскопическую картину. Через 96 часов проводили расчет величины TCID₅₀ методом Рида и Менча.

Оценка экспрессии мембранных рецепторов, используемых онколитическими вирусами

Для подтверждения В-клеточной направленности, полученных краткосрочных культур из опухолевого субстрата методом проточной цитометрии, выполнена постановка лимфоидной панели маркеров: CD19, CD10, CD20, CD5, CD3, kappa/lambda. Также проводилась оценка экспрессии мембранных рецепторов: антитела к антигену дифференцировки 155 (CD 155, BV421), антитела к антигену дифференцировки 46 (CD 46, BV510), антитела к антигену дифференцировки 54 (CD 54, APC), антитела к антигену дифференцировки 160 (CD 160, Alexa Fluor), антитела к антигену дифференцировки 55 (CD55 PE)- производства фирмы Biotline. Исследование проводилось на аппарате FACS Canto II.

Проведение высокопроизводительного секвенирования транскриптомов клеточных линий первичных краткосрочных лимфоидных культур

Суммарная РНК была выделена с помощью набора «MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit» на автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure Compact (Roche, Швейцария). Концентрацию РНК определяли при помощи спектрофотометра ND 1000 (NanoDrop Technologies) и флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Параметр RIN (RNA Integrity Number), характеризующий целостность РНК, оценивали на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США), для всех образцов клеточных линий его значение превышало 9, при максимальном 10. Библиотеки мРНК сделаны с помощью набора «TruSeq® DNA PCR-Free LT Sample Preparation Kit» (Illumina, США), использующего технологию обогащения матричной РНК связыванием олиго-dT последовательностей с ее полиаденилированными участками. Секвенирование транскриптома проводили на приборе NextSeq 500 System (Illumina, США) (SR, 75 циклов) в ЦКП «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Так как в задачи исследования входила только количественная оценка экспрессии генов, без учета альтернативного сплайсинга или фьюжн-транскриптов, и наша работа не была связана с секвенированием de novo, получение парноконцевых прочтений не требовалось. Для каждого образца было получено минимум 30 млн. прочтений.

Обработка данных, полученных в ходе секвенирования транскриптома

Последовательности одноконцевых прочтений были обработаны и отфильтрованы при помощи программного пакета trimmomatic. Затем при помощи алгоритма Kallisto выполнена процедура псевдо-картирования на транскриптом и оценка числа прочтений на

ген, отражающего уровень его экспрессии. Дальнейшая обработка данных, включая нормирование числа прочтений на ген, проведена в среде R с использованием пакета DESeq2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение краткосрочных культур опухолевых клеток лимфоидной природы от пациентов с В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями

Перед нами стояла задача получить первичные культуры В-ЛПЗ. Они были получены из биопсийного материала, взятого у пациентов с различными типами опухолей лимфоидной природы. Для получения краткосрочных культур клеток В-клеточных ЛПЗ была проведена детальная отработка условий каждого этапа обработки образцов интраоперационных биоптатов. Получение краткосрочных культур процесс крайне трудоемкий, он включал в себя ряд ответственных этапов, один из которых состоит в очистке опухолевого материала от фибробластов, клеток эндотелия, клеток микроокружения, в том числе Т-клеток. Особую проблему представляют фибробласты, которые активно пролиферируют и способны к десяткам делений до достижения состояния репликативного старения. При получении краткосрочных культур опухоли фибробласты способны быстро вытеснять клетки других типов, в том числе и опухолевые клетки. Одной из проблем также является контаминация бактериями и грибами из внешней среды, обусловленная недостаточной стерильностью при заборе материала. Более подробно условия культивирования описаны в разделе «Материалы и методы».

Ниже на Рисунке 1 представлены примеры полученных краткосрочных культур, пассированных в течение 5 дней на культуральном флаконе.

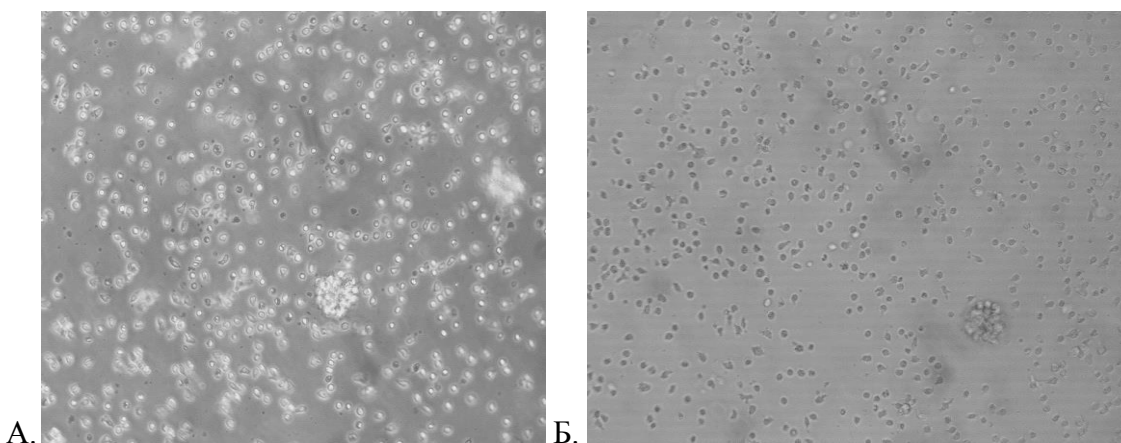


Рисунок 1 - Краткосрочные культуры опухолей лимфоидной природы

А. Лимфома из клеток маргинальной зоны

Б. Фолликулярная лимфома 1-2 морфологического типа

В ходе работы разработана методика получения краткосрочных культур клеток В-ЛПЗ из биоптатов опухолей (патент на изобретение № 2728266), было получено 54 краткосрочные культуры лимфоидной природы, проведена оценка онколитической активности непатогенных штаммов и изучена микроскопическая картина полученных культур. При просмотре капли суспензии, полученной краткосрочной лимфоидной культуры, нанеся ее на стекло под 10-кратным увеличением светового микроскопа визуализировались клетки округлой формы, иногда образующие гроздевидные структуры на 2-3 день после культивирования опухолевого субстрата (**Рисунок 1**).

Оценка онколитических свойств штаммов энтеровирусов на лимфоидных культуральных моделях *in vitro*

Вирусы способны избирательно реплицироваться в опухолевых клетках, стимулировать иммунные реакции, нацеленные на их уничтожение. Прямое онколитическое действие, основной механизм вирусного онколиза, хорошо изученный на сегодняшний день. Подобные свойства вирусов возможно детально рассмотреть и воспроизвести на моделях культур *in vitro*. Репликация вируса в опухолевых клетках индуцирует ряд реакций врожденного и адаптивного противоопухолевого иммунитета, и ведет к высвобождению из поврежденных опухолевых клеток опухоль-ассоциированных антигенов, ряда продуктов, активирующих иммунные клетки (это так называемые DAMP или молекулярные автографы поврежденных клеток), и вызывает секрецию клетками опухолевой стромы и самими опухолевыми клетками ряда факторов – хемокинов и цитокинов. Данные процессы приводят к снижению супрессивного действия опухолевого микроокружения и способствуют более эффективной атаке злокачественных клеток иммунными клетками. Ключевым фактором, определяющим способность конкретного штамма онколитического вируса оказывать терапевтическое воздействие на опухоль больного, является его способность эффективно реплицироваться в опухолевых клетках. С целью идентификации индивидуальных особенностей 5-ти штаммов онколитических энтеровирусов и вируса везикулярного стоматита в отношении и оценки способности

Рисунок 3. Тепловая карта, отражающая чувствительность онколитических вирусов в краткосрочных культурах (цветовая шкала отражает чувствительность опухолевых клеток к вирусам в образцах краткосрочных культур. Шкала от 1 (желтый цвет) до 8 (фиолетовый цвет) IgTCID 50/мл

При сравнении данных чувствительности с клинико-лабораторными показателями обращает на себя внимание, тот факт, что культуры с клетками фолликулярной лимфомы как 1-2 морфологического типа, так и 3 морфологического типа одинаково оказались чувствительны к вирусу ЖЭВ14, ECHO12, PV1S (**Рисунок 3**).

При сопоставлении клинических особенностей В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, лабораторных и инструментальных данных с эффективностью онколиза в культурах клеток, не выявлено явной ассоциации между химиочувствительностью опухоли и чувствительностью к онколитическим вирусам. Не обнаружено явной ассоциации между возрастом больных, прогностическим индексом заболевания, другими клинико-лабораторными параметрами и чувствительностью опухолевых клеток в культуре к онколитическим вирусам пациентов с В-ЛПЗ.

Оценка экспрессии мембранных рецепторов

Штаммы энтеровирусов, входящие в исследуемую панель, используют различные рецепторы для проникновения в клетку, что частично может объяснять различия в спектрах их действия на опухолевые клетки. Представители группы Коксаки В, к которым относятся штаммы ЖЭВ14 (Коксаки В5) и ЖЭВ15 (Коксаки В6), используют в качестве рецепторов белки CXADR и CD55. Непатогенный ЖЭВ7 (Эховирус 12) не использует белок CXADR, но для заражения этим вирусом важен белок CD55; штамм ЖЭВ8 (Коксаки А7), по-видимому, использует в качестве рецептора белок SCARB2; вакцинный штамм полиовируса I типа (PV1S), как и все полиовирусы, использует в качестве рецептора белок CD155.

Ниже приведена тепловая карта (**Рисунок 4**), отражающая сопоставление экспрессии поверхностных рецепторов на опухолевых клетках с нозологической формой.

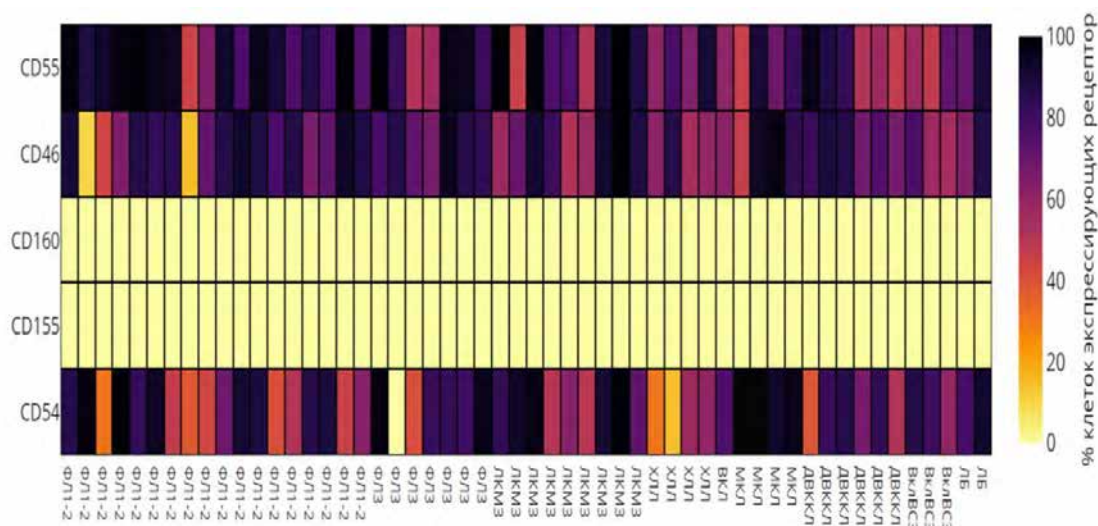


Рисунок 4. Тепловая карта, на которой обозначена экспрессия поверхностных рецепторов на опухолевых клетках CD55, PVR(CD155), ICAM1(CD54), CD46, CD160, цветовая шкала отражает количественное выражение в % от 0 (желтый цвет) до 100 (фиолетовый цвет)

Таблица 2. Коэффициент корреляции Пирсона (r) между процентом клеток, экспрессирующих вирусные рецепторы, и эффективностью репликации штаммов в культурах

Рецепторы	Коэффициент корреляции Пирсона (r) между процентом клеток, экспрессирующих вирусные рецепторы, и эффективностью репликации штаммов в культурах					
	LEV14	ECHO-12	PV1S	CVB6	CVA7	VSV-I
CD54	-0,006 (0,964)	0,115 (0,407)	0,031 (0,819)	0,009 (0,945)	0,103 (0,454)	0,114(0,408)
CD155	0 (1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)
CD160	0 (1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)	0(1)

CD46	0,214 (0,118)	0,042 (0,759)	0,212 (0,122)	-0,286 (0,035)	0,149 (0,279)	-0,195 (0,155)
CD55	0,111 (0,423)	0,015 (0,911)	0,083 (0,549)	-0,048 (0,726)	0,073 (0,598)	0,160 (0,244)

Обнаружен высокий уровень экспрессии рецепторов вируса кори (CD46 $75 \pm 18\%$), вирусов Коксаки группы А (CD55 $79 \pm 18\%$) и вирусов Коксаки группы В (CD54 $70 \pm 23\%$) во всех образцах краткосрочных лимфоидных культур и низкая экспрессия полиовирусного рецептора (CD155, $\leq 1\%$ клеток). Отмечено отсутствие выраженной зависимости между процентом клеток, экспрессирующих эти рецепторы, и эффективностью репликации в краткосрочных лимфоидных культурах. Не обнаружено зависимости между экспрессией мембранных рецепторов и нозологической формой лимфопролиферативного заболевания.

Анализ взаимосвязи эффективности репликации вирусов и перестройки гена *BCL-2* у пациентов, образцы краткосрочных культур В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, которых получены в ходе исследования

Апоптоз один из важнейших процессов, который участвует в различных физиологических процессах. *BCL-2* предотвращает апоптоз либо путем секвестрации цистеиновых протеаз, называемых каспазами или путем предотвращения высвобождения митохондриальных апоптогенных факторов, таких как цитохром. Как известно, семейство белков *BCL-2* управляет внутренним путем митохондриального апоптоза и функционирует как проапоптотический фактор – связывает и инактивирует проапоптотический белок BAX. Выявление перестройки гена *BCL-2* у пациентов, краткосрочные лимфоидные культуры клеток, которых были получены, коррелировало со способностью штаммов PV1-S и VSV-I эффективно реплицироваться в опухолевых клетках. Обнаружена связь между интенсивностью вирусной репликации PV1S (p-value=0,022) и VSV-I (p-value=0,015) в краткосрочных лимфоидных культурах и подтвержденной перестройкой гена *BCL-2*.

Одной из основных причин того, что полиовирус 1 типа обладает более выраженной репликацией в случаях наличия перестройки гена *BCL-2*, является тот факт, что он индуцируют проапоптотический белок, что тем самым препятствует апоптозу клетки, и за

данный период времени полиовирус 1 типа успевает реплицироваться в клетках, и вызывать вирусный онколиз.

Анализ данных транскриптомного секвенирования образцов краткосрочных опухолевых культур лимфоидной природы

Среди проанализированных образцов краткосрочных культур эффективно реплицировать ЖЭВ14 (TCID₅₀/мл $\geq 4,27$) оказались способны 39 культур. Проведен расчет дифференциально экспрессированных генов между группами чувствительных и нечувствительных линий, а затем рассчитывался коэффициент корреляции Спирмена между эффективностью вирусной репликации и уровнем экспрессии генов. Затем был произведен анализ обогащения, позволяющий определить достоверность вовлеченности отдельных сигнальных путей на основе списков генов, уровень экспрессии которых коррелирует с наличием или отсутствием биологического явления – эффективной вирусной репликации в клетке (в качестве меры вовлеченности используется коэффициент корреляции Спирмена, $p\text{-value} \leq 0,05$). В результате анализа проанализировано около 2 тысяч сигнальных путей. В процессе репликации онколитических вирусов принимает участие ряд сигнальных путей. Один из основополагающих сигнальных путей является путь эндоцитоза (**Рисунок 5**).

Эндоцитоз регулирует многие клеточные сигнальные процессы, в том числе количество функционирующих на поверхности клеток рецепторов. Отдельные сигнальные рецепторы различаются по своей способности подвергаться регулируемому эндоцитозу и могут избирательно вступать в различные клатрин-зависимые и клатрин-независимые взаимодействия. Непосредственным следствием регулируемого эндоцитоза с помощью различных механизмов является уменьшение количества рецепторов, присутствующих на поверхности клетки, и, таким образом, ослабление чувствительности клетки к внеклеточному лиганду. Эндоцитоз один из главных аспектов активации внеклеточных киназ, нужно отметить различное влияние киназ на эндоцитоз зависимые пути. Некоторые вирусы для проникновения в клетку используют мембранные рецепторы, однако, существуют рецептор-независимые механизмы вирусной интернализации. Таким образом, наличие вируссвязывающих рецепторов - не обязательное условие инфицирования клетки. Как было показано в различных работах, в ходе инфицирования клетки путем эндоцитоза, на эффективность развития вирусной инфекции могут оказывать

влияние отдельные белки, относящиеся к данному сигнальному пути. В частности, совсем недавно благодаря изучению полного генома, был идентифицирован липид-модифицирующий фермент PLA2G16, в качестве необходимого компонента в жизненном цикле пикорнавирусов. В ходе нашего анализа мы также выявили одну из ключевых фосфолипаз, принимающую участие как в клатрин-зависимом, так и в клатрин-независимом эндоцитозе, уровень экспрессии, которой достоверно коррелирует с эффективностью репликации штамма ЖЭВ14 ($R\text{-spirman}=0,61$, $p\text{-value}=0,012$) – *фосфолипаза Д (PLD2)*. Данный ген, кодирует белок, катализирующий гидролиз фосфатидилхолина до фосфатидной кислоты и холина. Белок локализуется на периферической мембране и участвует в организации цитоскелета, контроле клеточного цикла, регуляции транскрипции и/или регуляции секреции. Экспрессия генов, участвующих в сигнальном пути эндоцитоза *PLG2* и *GPCR* являются ключевым звеном в данном сигнальном пути. *PLG2* представляет собой фосфолипазу Д, принимающую участие в процессах ожирения и находится в отрезке геномного локуса, где располагаются его гомологи RARRES3, и HRASLS2. С другой стороны, фосфолипаза Д может действовать как клеточный датчик для повреждения мембран в местах, где осуществляется проникновение вируса. Так же, PLA2G16 может быть использован, как в иницировании образования пор, за счет увеличения размеров пор или в поддержании для доставки генома. Инактивация PLA2G16 приводили к устойчивости к энтеровирусам и полиовирусу 1 типа. Связанные с G белком рецепторы (*GPCR*) выполняет функцию активации внутриклеточных путей передачи сигнала, который приводит к клеточному ответу, а также управляет рядом физиологических процессов и является мишенью для лекарственных средств, уровень экспрессии данного гена достоверно коррелирует с эффективностью репликации штамма ЖЭВ14 ($R\text{-spirman}=0,67$, $p\text{-value}=0,005$). Связывание сигнальной молекулы с *GPCR* приводит к активации G-белка, а это в свою очередь запускает большое количество вторичных сигналов.

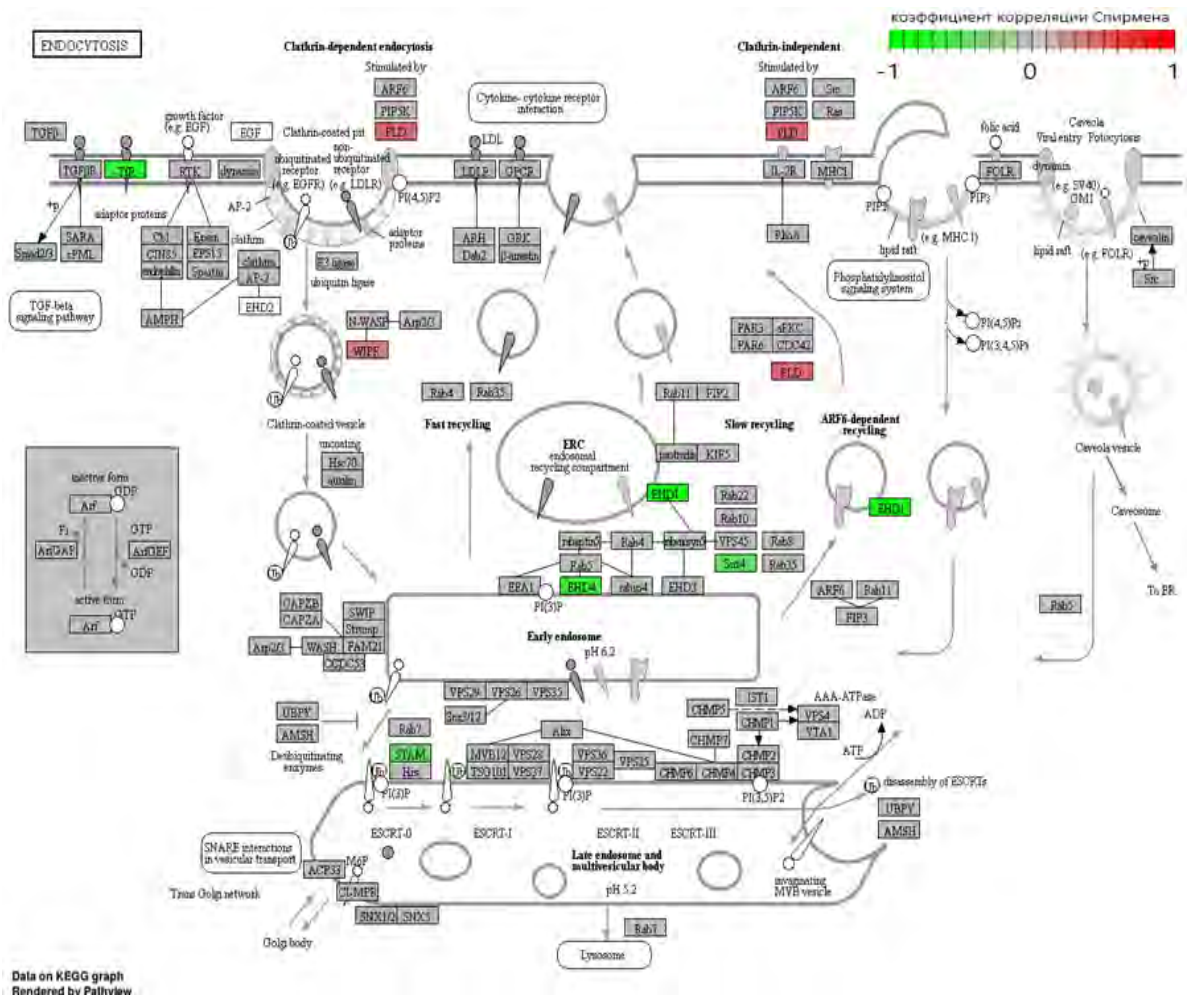


Рисунок 5. Цветовая диаграмма сигнального пути эндоцитоза, отражающая генные маркеры, ассоциированные с эффективностью репликации вируса ЖЭВ14, $p\text{-value}=0,05$

Для выявления потенциальных маркеров, которые могут служить для идентификации большей или меньшей чувствительности клеток к штаммам онколитических вирусов, был проведен отбор генов, демонстрирующих наибольшую корреляцию с репликационной способностью вирусов с максимальной положительной и отрицательной корреляцией, некоторые из которых представлены выше.

Благодаря выявленным генам создается задел для более детального изучения сигнальных путей, участвующих в инициации репликативной способности онколитических вирусов. Путь эндоцитоза, MAPK, путь молекул клеточной адгезии и везикулярного транспорта, вероятнее всего, являются главными сигнальными путями, задействованными в ходе репликации онколитических вирусов, при В-ЛПЗ. Дальнейшее изучение позволит перейти к созданию новых онколитических штаммов еще более эффективных в отношении В-ЛПЗ. Именно перекрытие сигнальных путей и выявление наиболее значимых для репликации онколитических вирусов является основной задачей для дальнейшего

возможного изучения. Данные, полученные в результате проведенных исследований, показывают, что в репликации вируса, обладающего высокой чувствительностью к опухолевым клеткам различной гистологической принадлежности, задействовано несколько сигнальных путей, которые в разной степени оказывают влияние на репликацию и ее значение в жизнедеятельности клетки. Совокупность взаимодействия сигнальных путей и генов, вовлеченных в них, играет ключевую роль в результатах воздействия вируса на клетку.

Выводы

1. Разработана методика получения краткосрочных культур клеток В-ЛПЗ из биоптатов опухолей (патент на изобретение № 2728266): получены 54 краткосрочные культуры (ФЛ1-2, ФЛЗ, ЛКМЗ, ХЛЛ, ВКЛ, ДВККЛ, МКЛ, ВклВСЗ, ЛБ) для проведения оценки онколитической активности непатогенных штаммов.
2. Выявлена высокая онколитическая активность вирусов ЖЭВ14, ЕСНО12 и PV1S в опухолевых клетках фолликулярной лимфомы 1-2 и 3 морфологических типов, диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы, лимфомы из клеток маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности, хронического лимфолейкоза ($IgTCID50/мл \geq 3,5$). Онколитическая активность вирусов ЖЭВ14, ЕСНО12, CVB6, CVA7, VSV-I и PV1S в культуре клеток волосатоклеточного лейкоза отсутствует.
3. Выявлен высокий уровень экспрессии рецепторов вируса кори ($CD46 75 \pm 18\%$), вирусов Коксаки группы А ($CD55 79 \pm 18\%$) и вирусов Коксаки группы В ($CD54 70 \pm 23\%$) во всех образцах краткосрочных лимфоидных культур и низкая экспрессия полиовирусного рецептора ($CD155, \leq 1\%$ клеток). Доказано отсутствие прямой зависимости между экспрессией вирусных рецепторов и эффективностью репликации в краткосрочных лимфоидных культурах. Зависимость между экспрессией мембранных рецепторов и нозологической формой лимфопролиферативного заболевания не обнаружена.
4. Обнаружена связь между интенсивностью вирусной репликации PV1S и VSV-I в краткосрочных лимфоидных культурах и подтвержденной перестройкой гена *BCL-2* (повышение 47% и 206% соответственно), что определяет потенциальную перспективность применения этих вирусов в терапии ЛПЗ с перестройкой *BCL-2*.
5. Резистентные случаи фолликулярной лимфомы 1-2 и 3 морфологических типов отличались высокой способностью реплицировать онколитические штаммы ЖЭВ-14, ЕСНО-12 и PV1S, что подтверждает потенциальную перспективность применения в таких

случаях непатогенных штаммов онколитических вирусов в качестве терапевтических агентов.

6. Эффективная репликация онколитических вирусов определяется состоянием большого числа сигнальных путей, в том числе, одним из ключевых – сигнального пути эндоцитоза ($p\text{-value}=0,005$) и уровнем экспрессии генов *PLD* ($p=0,0012$) и *GPCR* ($p=0,005$).

Практические рекомендации

Среди исследованных непатогенных штаммов энтеровирусов наиболее перспективными для лечения В-ЛПЗ являются ЖЭВ14, ЖЭВ7 (ЕСНО12), полиовирус 1 типа (штамм Сэбин, PV1S).

Определение перестройки гена *BCL-2* у пациентов, является важным прогностическим маркером, определяющим эффективность использования PV1S для лечения В-ЛПЗ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бабаева Ф. Э. Исследование репродукции онколитических вирусов в органных культурах лимфоидных опухолей человека. / Ф. Э. Бабаева, А. В. Липатова, Д. В. Кочетков, П. М. Чумаков, С. К. Кравченко, //Онкогематология. – 2019. – Т. 14. – №. 4.
2. Липатова А. В. Влияние рецепторов клетки на чувствительность опухолевых клеток к онколитическим энтеровирусам / А. В. Липатова, Т. Х.Ле, А. О. Сосновцева, Ф. Э. Бабаева, Д. В. Кочетков, П. М. Чумаков //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166. – №. 7. – С. 66-70.
3. Патент на изобретение - Бабаева Ф.Э. Способ культивирования клеток злокачественных лимфоидных опухолей / Ф.Э. Бабаева, А.В. Липатова, Д.В. Кочетков, П.М. Чумаков, С.К. Кравченко, У.Л. Джулакян //Бюллетень «Изобретения и полезные модели» - от 28.07.2020 г., патент № RU2728266.
4. Babaeva F.E. Evaluation of a panel of non-pathogenic enterovirus strains as potential oncolytic agents for the therapy of malignant lymphomas/ F.E. Babaeva, A.V. Lipatova,

- D.V. Kochetkov, S.K. Kravchenko, P.M. Chumakov // FEBS EMBO 2019 Conference, Krakow, Poland, 6-11 July, 2019.
5. Бабаева Ф.Э. Оценка онколитических свойств панели непатогенных штаммов энтеровирусов для терапии злокачественных лимфом / Ф.Э.Бабаева, А.В.Липатова, Д.В. Кочетков// Интернаука, июнь 2019 года, Москва.
 6. Бабаева Ф.Э. Омиксный анализ детерминант неходжкинских лимфом для выявления индивидуальных различий заболевания, влияющих на чувствительность к онколитическим вирусам/Ф.Э.Бабаева, А.В.Липатова, Д.В.Кочетков, П.М.Чумаков, С.К. Кравченко// Конгресс гематологов, 16-18 апреля 2020 года, Москва.
 7. Babaeva F.E. Simultaneous analysis of oncolytic viruses' reproduction and RNASeq transcriptome data in short-term lymphoid cultures for identification of biomarkers for viral therapy effectiveness prediction/F.E. Babaeva, A.V. Lipatova, D.V. Kochetkov, S.K. Kravchenko, P.M. Chumakov // Soho Congress, September 9- 12, 2020, Houston, Texas, USA.
 8. Бабаева Ф.Э. Совместный анализ репродукции онколитических вирусов и данных транскриптомного секвенирования для идентификации биомаркеров эффективности вирусной терапии/Ф.Э.Бабаева, А.В.Липатова, Д.В.Кочетков, П.М.Чумаков, С.К. Кравченко// Злокачественные лимфомы 29-30 октября 2020 года, Москва.