

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ТРАНСДУКЦИИ ИХ ГЕНОМ ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА В СОСТАВЕ БАКУЛОВИРУСНОГО ВЕКТОРА

А.А. Лихова¹, Н.И. Семесюк¹, Н.А. Безденежных¹, О.А.Ковалева¹,
Л.И. Строчковская², А.Л. Воронцова¹, Ю.И. Кудрявец¹

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Резюме. Цель: изучить изменения некоторых биологических и цитогенетических характеристик клеток меланомы мыши после трансдукции их геном интерферона-бета (ИФН-бета) в составе бакуловирального вектора. **Материалы и методы:** модель меланомы мыши (линия ММ-4). Использовали методы трансдукции клеток рекомбинантным бакуловиром, культуры клеток и цитогенетический анализ. **Результаты:** исследования кинетики роста клеток меланомы как в присутствии сыворотки, так и в безсывороточной среде, способности к миграции в условиях *in vitro*, показали, что трансдукция этих клеток рекомбинантным бакуловиром, содержащим ген ИФН-бета, сопровождается значительным снижением скорости и плотности роста клеток, а также угнетением их способности к миграции *in vitro*. Кроме того, цитогенетический анализ исследуемых клеток показал, что только трансдукция клеток рекомбинантным бакуловиром с геном ИФН-бета приводит к существенному снижению пролиферативной активности клеток меланомы и провоцирует генотоксический эффект. **Выводы:** трансдукция клеток меланомы мыши рекомбинантным бакуловиром с геном ИФН-бета мыши приводит к подавлению признаков злокачественности и пролиферации опухолевых клеток и индуцирует генотоксический эффект.

Ключевые слова: интерферон-бета, рекомбинантный бакуловир, опухолевые клетки, кинетика роста, миграция, генотоксическое действие.

STUDY OF CHANGES IN SOME BIOLOGICAL AND CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF TUMOR CELLS TRANSDUCE BY RECOMBINANT BACULOVIRUS WITH IFN-BETA GENE

A. Lykhova¹, N. Semesiuk¹, N. Bezdenzhnykh¹, O.Kovaleva¹,
L.I. Strokovskaya², A. Vorontsova¹, Yu. Kudryavets¹

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
NAS of Ukraine, Kyiv

²Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

Summary. Objective: To investigate the changes in some biological and cytogenetic characteristics of mouse melanoma cells transduced by mouse interferon-beta (IFN-beta) gene in baculovirus vector. **Materials and Methods:** Studies were

performed on B16 mouse melanoma (MM-4 cell line). Transduction, cell biology approaches and cytogenetic analysis have been used in this study. Results: study the growth kinetics of melanoma cells, as in the presence of serum and in serum-free medium, and the migration ability in vitro, showed that transduction of these cells by recombinant baculovirus with IFN-beta gene is accompanied by a significant decrease in rate and density of cell growth, and inhibition of their migration ability in vitro. In addition, cytogenetic analysis of target cells showed that transduction of MM-4 cells with IFN-beta gene leads to significant decrease of their proliferative activity and induces genotoxic effects. Conclusions: transduction of the mouse melanoma cell by mice IFN-beta gene results in suppression of malignancy and proliferation of tumor cells and causes genotoxic effects.

Key words: *interferon-beta, recombinant baculovirus, tumor cells, growth kinetics, cell migration, genotoxic effect.*

Меланома належить до категорії найбільш агресивних форм новоутворень; її дисемінація, лімфогенним чи гематогенним шляхом, відбувається дуже рано і, незважаючи на радикальне видалення первинної пухлини, залишається високий ризик рецидиву процесу. Доцільність використання інтерферону (ІФН) в якості прямого протипухлинного чинника або як елемента оптимізації комплексного лікування хворих на меланому, спрямованого на зниження ризику метастатичного процесу та підвищення якості життя онкологічних хворих, достатньо обґрунтована експериментальними та клінічними дослідженнями [1, 5].

ІФН-бета – плейотропний цитокін, який володіє антивірусною, антипроліферативною, імуномодулюючою та антиангіогенною активністю. Використання ІФН-бета у монотерапії хворих на лімфоми і солідні пухлини у ряді випадків не виявило високої ефективності, оскільки маса пухлини і висока швидкість її росту часто не залишає часу для прояву всього спектру протипухлинних властивостей ІФН, а його ріст-інгібуюча дія може реалізуватись лише за умов високої локальної концентрації цитокіну у пухлині та її високої чутливості до дії ІФН [6]. Однак відповідну концентрацію ІФН в пухлині не завжди вдається створити при парентеральному введенні через швидкий його кліренс, системну токсичність та резистентність пухлинних клітин до цитокіну [9]. Пегільовані форми ІФН, на жаль, не вирішують існуючі в онкології проблеми. Таким чином, для рішення проблеми низької ефективності ІФН при лікуванні онкологічних захворювань необхідний пошук нових підходів. Таким підходом, що може забезпечити таргетну доставку цитокіну в пухлинні клітини та дозволяє створити локально високу концентрацію цитокіну в пухлині, є застосування генної терапії раку, яка базується на використанні генетичних конструкцій, що несуть вбудовані в них гени цитокінів, зокрема і ІФН-бета.

Цікавість до бакуловірусів (БВ), як до лікувальних транспортерів рекомбінантних молекул, обумовлена їхньою здатністю до синтезу великої кількості рекомбінантних білків в клітинах ссавців і, разом з тим, відсутністю патогенності для ссавців: в їхніх клітинах відсутня реплікація і виражена цитотоксичність БВ [2]. Для генної терапії використовують рекомбінантні БВ (рБВ) як для трансдукції генів в клітини *in vitro*, так і в дослідях *in vivo*, коли вірус вводять в пухлину або внутрішньовенно [10]. В останньому випадку БВ сам спрацьовує як виразний індуктор цитокінів, включаючи ІФН і деякі інтерлейкіни.

Слід підкреслити, що практично всі дослідження щодо генної терапії раку чи лейкозів за допомогою ІФН орієнтовані тільки на рівень його продукції і майже не вивчаються особливості впливу самої бакуловірусної векторної системи з геном ІФН на біологічні властивості пухлинних клітин або мінливість їхніх цитогенетичних характеристик. Разом з тим, коли носієм вектору і продуцентом ІФН є сама пухлинна клітина, протипухлинна дія генної терапії з бакуловірусом, на нашу думку, може бути обумовлена дією комплексу факторів. Ці фактори включають сам рекомбінантний ІФН-бета, який: а) може продукуватись у різному вигляді і діяти локально в межах осередку пухлинного росту та б) потрапляючи у кровообіг може діяти системно через активацію різних ланок імунної системи. З другого боку клітинні носії цитокіну, модифіковані рБВ і ІФН-бета, можуть виступати активним антигенним подразником для активованих ІФН імунних клітин.

Мета роботи – порівняльне дослідження біологічних і цитогенетичних особливостей пухлинних клітин меланоми, трансдукованих *in vitro* геном ІФН-бета в складі бакуловірусного вектору або оброблених екзогенним ІФН-бета *in vitro*.

Матеріали і методи досліджень. Об'єктом досліджень була модель меланоми миші (лінія ММ-4) [10]. В якості контролю використовували клітини ММ-4 без обробки або ті, що взаємодіяли з контрольним бакуловірусом без гену ІФН (ММ-4/БВ). В основній групі були клітини ММ-4 трансдуковані бакуловірусним вектором з геном ІФН-бета миші (ММ-4/БВ/ІФН), а також клітини ММ-4, що культивували в присутності 1000 МО/мл екзогенного ІФН-бета (ММ-4+ІФН). У даній роботі ми використовували методи трансдукції клітин рБВ, культивування клітин та цитогенетичний аналіз як вказано раніше [7]. Статистичний аналіз проводили за t-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Трансдукція клітин меланоми лінії ММ-4 рекомбінантними бакуловірусами з геном ІФН-бета супроводжується, як показано нами раніше [10], продукцією ІФН-бета як секреторного білка і як компонента своєрідного спеціалізованого

клітинного компартменту у вигляді клітинних везикул. На цей час добре відома послідовність дії ІФН через рецептори клітинної поверхні, однак як діє ІФН на пухлинні клітини у складі клітинних везикул, які можуть доставляти ІФН до клітинного цитозолу через механізм ендцитозу, на цей час не встановлено. Важливо було визначити у порівняльному аспекті деякі особливості біологічної дії на пухлинні клітини окремо рекомбінантного білка ІФН-бета і його дії як продукту трансдукованого гена, що виділяється самою пухлинною клітиною.

Дослідження кінетики росту клітин лінії ММ-4 після їх трансдукції рБВ або після обробки екзогенним ІФН-бета протягом 10 діб, показали, що час подвоєння клітин в контрольній групі дорівнює 18 год, а після трансдукції клітин бакуловірусним вектором без вбудованих генів цей показник дещо збільшується (до 20 год). Після обробки клітин екзогенним ІФН-бета час подвоєння культури зростав до 23 год, однак найбільш суттєву затримку швидкості росту клітин ММ-4 спостерігали після трансдукції рБВ з геном ІФН-бета – 30 год ($P < 0,01$) (рис. 1).

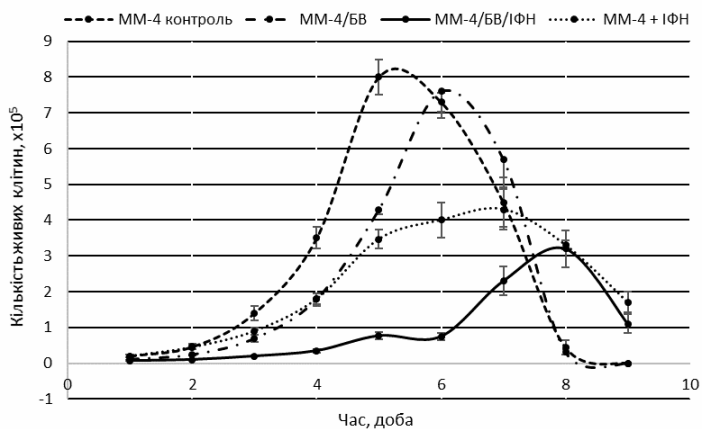


Рис. 1. Зміни кінетики росту клітин лінії ММ-4 після їх трансдукції бакуловірусними векторами або після обробки екзогенним ІФН-бета

З наведеного рис.1 видно, що найбільшу щільність клітинного росту мають клітини контролів ММ-4 – $4,5 \times 10^5$ кл/см² та ММ-4/БВ – $4,3 \times 10^5$ кл/см², в порівнянні з такими показниками в основній групі ММ-4/БВ/ІФН та ММ-4+ІФН – $1,8 \times 10^5$ кл/см² та $2,5 \times 10^5$ кл/см², відповідно ($P < 0,001$).

Пухлинні клітини, як відомо, характеризуються високим ступенем автономності і здатністю самостійно підтримувати проліферативний

потенціал за автокринним механізмом за рахунок продукції факторів росту та деяких поживних речовин. Здатність клітин рости в поживному середовищі з низьким вмістом сироватки є однією з кардинальних ознак злочисливості пухлинних клітин [4].

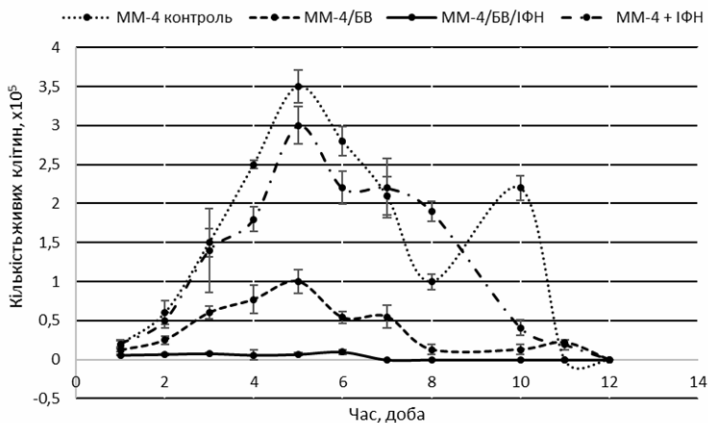


Рис. 2. Кінетика росту клітин лінії MM-4 в поживному середовищі, що не містить сироватки, після їх трансдукції різними типами бакуловірусів або після обробки ІФН-бета

Отримані нами результати показали, що трансдукція клітин MM-4 рБВ з геном ІФН-бета призводить до значного пригнічення здатності цих клітин рости в поживному середовищі, що не містить сироватки, в порівнянні з іншими досліджуваними групами. В цьому випадку, щільність клітинного росту була найменшою в групі MM-4/БВ/ІФН і дорівнювала $0,06 \times 10^5$ кл/см², тоді як в контролі цей показник становив 2×10^5 кл/см² ($P < 0,001$). В групах MM-4/БВ та MM-4+ІФН щільність росту культури становила $0,6 \times 10^5$ кл/см² та $1,7 \times 10^5$ кл/см², відповідно. Звертає на себе увагу той факт, що найбільш значне пригнічення здатності клітин меланоми рости в без сироватковому середовищі спостерігається саме після їх трансдукції рБВ (рис. 2).

Окрім того, час подвоєння досліджуваних клітин значно змінювався саме в результаті трансдукції клітин різними типами бакуловірусів: при трансдукції клітин БВ та БВ/ІФН цей показник дорівнював 32 та 145 год, відповідно, коли час подвоєння клітин в контрольній групі становив 24 год. Разом з тим, культивування MM-4 в присутності екзогенного ІФН-бета суттєво не впливало на швидкість росту клітин в безсироватковому середовищі – час подвоєння клітин в

культури дорівнював 26 год. Це свідчить, що екзогенний ІФН пригнічує поділ пухлинних клітин переважно не за рахунок пригнічення в пухлинних клітинах продукції факторів росту чи їх рецепторів, що контролюють проліферативний потенціал. Значна ефективність дії БВ/ІФН в цьому випадку, порівняно з самим ІФН-бета чи з чистим БВ-вектором, дозволяє припустити особливу роль в протипухлинній дії ІФН-бета саме його компартменталізованої форми, яка може діяти через ендцитоз прямо на клітинне ядро і Toll-like рецептори в клітині.

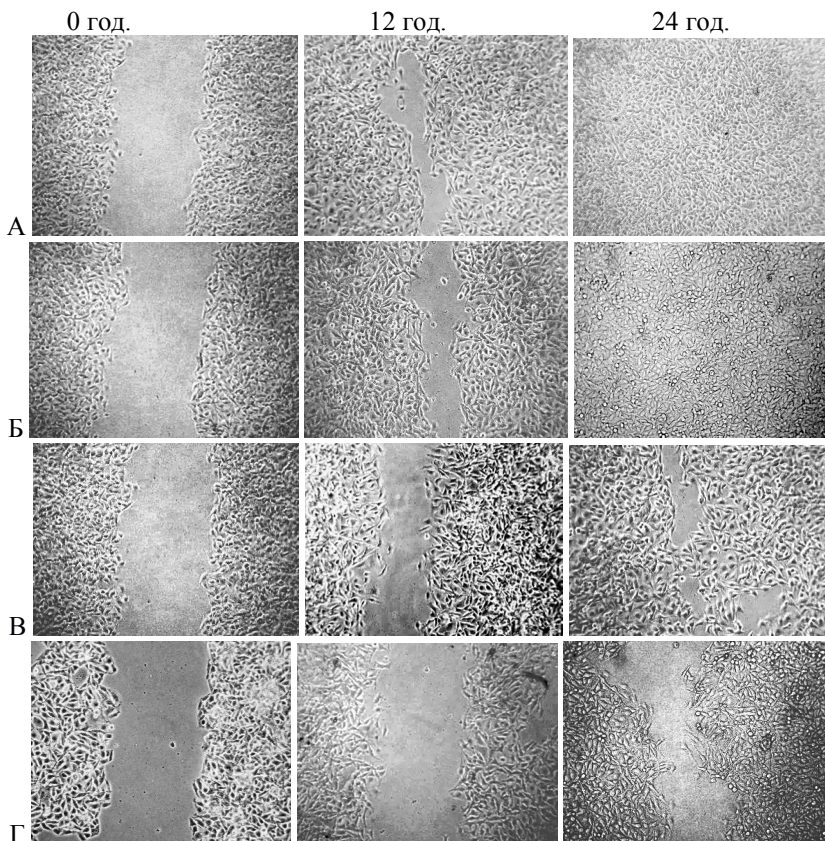


Рис. 3. Аналіз швидкості міграції клітин меланоми *in vitro* методом scratch assay після трансдукції їх БВ векторами або після обробки екзогенним ІФН-бета

А – MM-4 контроль, Б – MM-4/БВ, В – MM-4+IFN, Г – MM-4/БВ/ІФН.

Ще один важливий показник злоякісності пухлинних клітин – це їхня здатність до міграції. Одним з найпростіших методів аналізу швидкості міграції клітин *in vitro* є scratch assay. Цей метод має декілька переваг. В першу чергу, міграція клітин *in vitro* до деякої міри подібна до їхньої міграції в умовах *in vivo*. Крім того, він може використовуватися для вивчення механізмів регуляції клітинної міграції через взаємодію клітин поміж собою та з позаклітинним матриксом [8].

Наші дослідження показали (рис.3), що трансдукція гена рекомбінантного ІФН-бета в клітини лінії ММ-4 або їх обробка екзогенним ІФН-бета спричиняє значне пригнічення міграційної активності цих клітин *in vitro*. Якщо контрольні клітини ММ-4 і ММ-4/БВ відновлюють цілісність моношару вже через 24 год. після нанесення пошкоджень, то клітини ММ-4+ІФН відновлюють пошкодження моношару через 50 годин, а клітини ММ-4/БВ/ІФН тільки через 72 години (рис. 3). Це ще раз вказує на суттєву різницю у механізмі дії чистого ІФН-бета і його ж, «автопродукованого» пухлинними клітинами як продукту рекомбінантного гену.

Проведений нами цитогенетичний аналіз досліджуваних клітин показав, що саме трансдукція клітин ММ-4 рБВ з геном ІФН-бета призводить до статистично достовірного підвищення рівня виникнення ядерних аномалій (протрузій ядра) в 2 рази та зниження кількості мітозів в 3 рази, в порівнянні з контролем (Таблиця 1).

Таблиця 1

**Цитогенетичні характеристики клітин лінії ММ-4
після трансдукції їх рекомбінантними бакуловірусами
або після обробки екзогенним ІФН-бета**

	ПКХ	КМЯ	Мітоз	Протрузії ядра
ММ-4 контроль	4,0±2,6	0,3±0,6	18,3±4,6	8,3±1,2
ММ-4/БВ	2,7±0,6	1,0±1,0	17,3±3,0	8,7±3,0
ММ-4/БВ/ІФН	1,3±1,5	2,0±1,0	5,3±0,6*	14,3±0,88**
ММ-4+ІФН	1,3±0,6	2,0±1,0	14,0±2,0	12,3±4,0

Примітка: * p < 0,05, ** p < 0,01

Бакуловіруси, або віруси ядерного поліедрузу, є смертельними агентами для комах, розмножуючись в ядрі їхніх клітин, однак не патогенні для клітин ссавців. Однак існують дані, що одним із наслідків проникнення бакуловіруса в клітини ссавців і подальшого його

транспортування в ядро є суттєва модифікація архітекτονіки ядра трансдукованих клітин [3]. Отримані нами нові дані щодо появи підвищеного рівня протрузій ядра в клітинах ММ-4, трансдукованих БВ/ІФН, свідчать про токсичну дію даного вірусу на клітини, що може супроводжуватись їхньою загибеллю. На нашу думку, рекомбінантний ІФН-бета підсилює цей ефект БВ, оскільки цей цитокін стимулює, як відомо, апоптоз пошкоджених вірусом клітин.

Таким чином, результати наших досліджень показали, що трансдукція клітин меланоми рБВ з геном ІФН-бета миші призводить до значних змін біологічних параметрів пухлинних клітин, асоційованих з їхньою злоякісністю: зниження швидкості і щільності росту клітин ММ-4, пригнічення здатності рости в поживному середовищі за відсутності сироватки та швидкості міграції клітин *in vitro*. Окрім того, трансдукція клітин рБВ з геном ІФН-бета спричиняє виникнення ядерних аномалій і пригнічення проліферативної активності клітин.

Подяка. Результати даної роботи були отримані за підтримки Гранту Президента України для обдарованої молоді (договір №54/43 від 6.08.2014 р.) та НДР за договором №2.2.5.388 від 13.02.2014 р. за підтримки НАН України.

Література

1. Лікування хворих із мікрометастазами меланоми шкіри у сторожових лімфатичних вузлах / С.І. Коровін [та ін.] // Клиническая онкология. – 2014. – № 2(14). – С. 9–11.
2. Baculovirus-mediated gene delivery into Mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression / C. Kenoutis [et al.] // J. Virol. – 2006. – V. 80. – P. 4135–4146.
3. Baculovirus-mediated immediate-early gene expression and nuclear reorganization in human cells / J. P. Laakkonen [et al.] // Cell. Microbiol. – 2008. – V. 10. – № 3. – P. 667–681.
4. Chigira M. Autonomy in tumor cell proliferation / M. Chigira, K. Noda, H. Watanabe // Medical Hypotheses. – 1900. – V. 32. – 1990. – P. 249–254.
5. Davar D. Adjuvant Therapy for Melanoma / D. Davar, A.A. Tarhini, J.M. Kirkwood // Cancer J. – 2012. – V. 18(2). – P. 192–202.
6. Friedman R. Clinical uses of interferons / R. Friedman / Br J Clin Pharmacol. – 2008. – V. 65. – № 2. – P. 158–162.
7. Kovalova O.A. Nonchromosomal cytogenetic analysis of mammal somatic cells / O.A. Kovalova, N.A. Bezdeneznykh, Y.I. Kudryavets // Biopolym. Cell. – 2013. – V. 29(1). – P. 33–41.
8. Liang Ch. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro / Ch. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan // Nature protocols. – 2007. – V. 2. – P. 329–333.

9. Pharmacodynamics of Recombinant IFN- β During Long-Term Treatment of Malignant Melanoma / G. Fierlbeck [et al.] // Journal of Interferon & Cytokine Research. – 1996. – V. 10. – P. 777–781.

10. Suppression of tumorigenicity and metastatic potential of melanoma cells by transduction of interferon gene / A.A. Lykhova [et al.] // Biopolym. Cell. – 2014. – V. 30(1). – P. 61–67.

УДК 616.155.392.8-616.155.392-036.11:612

ПОЛІПЛОЇДІЯ ТА ІНШІ ХРОМОСОМНІ АНОМАЛІЇ СТИМУЛЬОВАНИХ *IN VITRO* КЛІТИН ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ПРИ ІДІОПАТИЧНОМУ МІЄЛОФІБРОЗІ

Р.Ю. Лозинський

Державна установа «Інститут патології крові та трансфузійної медицини
Національної академії медичних наук України», Львів

Резюме. *Каріотип стимульованих гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором клітин периферичної крові хворих на ідіопатичний мієлофіброз характеризується широким спектром цитогенетичних аномалій від аберацій окремих хромосом до поліплоїдії. Ці зміни можуть розкрити нові патогенетичні механізми розвитку ідіопатичного мієлофіброзу та стати прогностичними маркерами для діагностики та моніторингу даного захворювання.*

Ключові слова: *ідіопатичний мієлофіброз, Г-КСФ, каріотип.*

ПОЛИПЛОИДИЯ И ДРУГИЕ ХРОМОСОМНЫЕ АНОМАЛИИ СТИМУЛИРОВАННЫХ *IN VITRO* КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ МИЕЛОФИБРОЗЕ

Р.Ю. Лозинский

Государственное учреждение «Институт патологии крови и трансфузионной
медицины Национальной академии медицинских наук Украины», Львов

Резюме. *Каріотип стимулированных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором клеток периферической крови больных идиопатическим миелофиброзом характеризуется широким спектром цитогенетических аномалий от аберраций отдельных хромосом к полиплоидии. Эти изменения могут раскрыть новые патогенетические механизмы развития идиопатического миелофиброза и стать прогностическими маркерами для диагностики и мониторинга данного заболевания.*

Ключевые слова: *идиопатический миелофиброз, Г-КСФ, каріотип.*