

# Модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 на мышах линии nude для исследования онколитической активности вируса осповакцины

Г.В. Кочнева<sup>1</sup>, А.А. Гражданцева<sup>1</sup>, Г.Ф. Сиволобова<sup>1</sup>, А.В. Ткачева<sup>1,2</sup>, А.Н. Швалов<sup>1</sup>, А.Ю. Юнусова<sup>2</sup>, Е.И. Рябчикова<sup>2</sup>, С.В. Нетесов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Мышам линии nude подкожно прививали клетки карциномы человека A431 в двух удаленных друг от друга точках. Один из двух сформировавшихся ксенографтов использовали для лечения рекомбинантным вирусом осповакцины, а второй служил искусственным метастазом. В работе использовали аттенуированный рекомбинантный вирус осповакцины (BOB) VVdGF-GFP2, штамм Л-ИВП (GenBank accession number KP233807), с делециями двух генов вирулентности – вирусного ростового фактора и тимидинкиназы, в район которой был встроен ген зеленого флюоресцентного белка GFP2. Лечение проводили путем однократного введения внутрь опухоли рекомбинантного BOB в дозе  $10^7$  БОЕ/мышь. Вирус обнаруживался в клетках искусственного метастаза уже через двое суток после инфицирования, а через 8 сут достигал концентраций, сравнимых с инфицированной опухолью ( $\sim 10^9$  БОЕ/мл). Ультраструктурное исследование показало избирательное размножение рекомбинантного вируса в опухолевых клетках. Адресное накопление GFP2 в узлах опухоли и метастаза продемонстрировано на УФО-изображениях мышей, полученных с использованием In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Германия). Полная деструкция ткани опухоли регистрировалась через 12 сут, а метастаза – через 20 сут после инъекции VVdGF-GFP2. В обоих случаях деструкция сопровождалась выраженным отеком и лейкоцитарной инфильтрацией ксенографтов. Рекомбинантный вирус индуцировал значимое уменьшение размеров опухоли и метастаза, к окончанию эксперимента (35-е сут) размер ксенографтов контрольных мышей в 10 раз превышал аналогичный параметр леченных ( $5\,000$  против  $500\text{ мм}^3$ ). Проведенное исследование показывает, что аттенуированный BOB даже при локальном периферическом способе введения не только способен разрушать ткань первичного опухолевого узла, но и обладает отчетливым антиметастатическим действием.

Ключевые слова: рекомбинантный вирус осповакцины; карцинома человека A431; ксенографт; модельный метастаз; онколитическая активность.

## A model of the artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for examination of the oncolytic activity of vaccinia virus

G.V. Kochneva<sup>1</sup>, A.A. Grazhdantseva<sup>1</sup>, G.F. Sivolobova<sup>1</sup>, A.V. Tkacheva<sup>1,2</sup>, A.N. Shvalov<sup>1</sup>, A.Yu. Unusova<sup>2</sup>, E.I. Ryabchikova<sup>2</sup>, S.V. Netesov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> The State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Novosibirsk region, Koltsovo, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Human carcinoma A431 cells were subcutaneously injected into nude mice at points remote from each other. One of the two xenografts developed afterwards was used for treatment with a recombinant vaccinia virus, while another served as an artificial metastasis. We used the attenuated recombinant vaccinia virus (VACV) VVdGF-GFP2 of the L-IVP strain (GenBank accession number KP233807), with deletion of two virulence genes: the virus growth factor and thymidine kinase, with the gene for the green fluorescent protein (GFP2) inserted in an area of the latter. Treatments was performed by a single intratumoral injection of the recombinant VACV at a dose of  $10^7$  PFU/mouse. VACV was detected in cells of the artificial metastasis as early as two days following infection, and after 8 days virus concentrations were comparable with those in the infected tumor ( $\sim 10^9$  PFU/ml). Electron microscopy revealed selective replication of the recombinant in tumor cells. Targeted accumulation of GFP2 in both tumor and metastasis was shown in the UV-images of the mice obtained using the In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Germany). Complete destruction of the tumor was registered after 12 days, and that of metastasis, after 20 days post injection of VVdGF-GFP2. The destruction process was accompanied by pronounced edema and leukocyte infiltration of tumor tissue. The recombinant virus induced a significant reduction in the sizes of the tumor and metastasis:

by the end of the experiment (35 days) the xenografts in the control mice were 10 times larger than those in the treated mice (5 000 vs. 500 mm<sup>3</sup>). Our study showed that the attenuated VACV administered by the peripheral route not only is able to destroy the primary tumor, but also has a distinct antimetastatic action.

Key words: recombinant vaccinia virus; human carcinoma A431; xenografts; metastasis model; oncolytic activity.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Ткачева А.В., Швалов А.Н., Юнусова А.Ю., Рябчикова Е.И., Нетесов С.В. Модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 на мышах линии nude для исследования онколитической активности вируса осповакцины. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):480-486. DOI 10.18699/VJ15.064

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Shvalov A.N., Unusova A.U., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. A model of the artificial metastasis of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice for examination of the oncolytic activity of vaccinia virus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):480-486. DOI 10.18699/VJ15.064

Вирус осповакцины (ВОВ) в настоящее время широко используется для создания противоопухолевых препаратов (Кочнева и др., 2012). Это объясняется, прежде всего, его природными онколитическими и иммуногенными свойствами, безопасностью для человека и возможностью модификации генома, а также способностью системно распространяться по организму и накапливаться в клетках модельных опухолей (Breitbach et al., 2012). Для предотвращения возможных осложнений у иммунодефицитных больных в онкотерапии используются аттенуированные штаммы ВОВ. Показано, что элиминация генов тимидинкиназы (*tk*) и ростового фактора (*VGF* – virus growth factor) ВОВ приводит к практически полному отсутствию репликации вируса в неделящихся клетках (McCart et al., 2007), при этом эффективность разрушения раковых клеток такими двойными мутантами (VVdd) не отличается от исходного штамма (Thorne et al., 2007).

В то же время аттенуация снижает способность штаммов ВОВ к диссеминации по организму, и даже штаммы высокопатогенных для своих хозяев ортопоксвирусов, таких как вирус оспы мышей (ectromelia), дефектные по тимидинкиназе, репродуцируются и выявляются только в месте введения (Kochneva et al., 1994). Тем не менее дефектные по тимидинкиназе мутанты ВОВ при внутривенном введении способны достигать опухолей человека и размножаться в них (Thorne et al., 2007). Однако количество вируса, попадаемое в опухоль при внутривенном введении, очень мало, и требуется достаточно много времени, для того чтобы проявился онколитический эффект (Weibel et al., 2011), а также введение высоких доз вируса (Breitbach et al., 2011). Кроме того, было показано, что негативный по тимидинкиназе вирус осповакцины способен инфицировать клетки эндотелия сосудов и эффективно разрушать васкуляризацию опухоли (Breitbach et al., 2013). Механизм такого разрушения до конца не выяснен, поэтому существует вероятность повреждения сосудов в других органах и тканях организма, а внутривенное введение больших доз вируса осповакцины может негативно сказываться на организме в процессе лечения.

Эффективность внутриопухолевого введения аттенуированных вариантов ВОВ была показана на широком наборе опухолей человека (Haddad et al., 2012), однако антиметастатический эффект при таком способе введе-

ния изучен недостаточно. В данной работе предложена модель искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 в виде двух подкожных ксенографтов, привитых одной и той же мышце линии nude. Структура ксенографтов карциномы A431 была нами изучена ранее (Юнусова и др., 2014). Показано, что ксенографты (опухолевые узлы) карциномы A431 окружены соединительнотканной капсулой, которая обеспечивает неинвазивность опухоли в организме мышей. Для оценки онколитической активности был сконструирован двойной рекомбинантный вариант ВОВ (VVdGF-GFP2) с делециями *VGF*-гена (фенотип VGF<sup>-</sup>) и *tk*-гена (фенотип TK<sup>-</sup>). В район делеции *tk*-гена дополнительно введен репортерный ген, экспрессирующий зеленый флюоресцентный белок GFP2 (фенотип GFP<sup>+</sup>). Вирус вводили интрамурально только в один ксенографт карциномы A431, второй же использовали в качестве искусственного метастаза.

Цель исследования заключалась в оценке диссеминации аттенуированного вируса осповакцины VVdGF-GFP2 с фенотипом VGF<sup>-</sup>TK<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup> в органы nude мышей и динамики его накопления в опухоли и модельном метастазе на основе ксенографтов эпидермоидной карциномы A431.

#### Материалы и методы

Клетки почки африканской зеленой мартышки CV-1, дефектные по тимидинкиназе фибробласты эмбриона крысы Rat2 TK<sup>-</sup>, и клетки эпидермоидной карциномы человека A431 выращивали на среде DMEM (Invitrogen) с добавлением 10 %-й эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone).

Вирус осповакцины со встройкой гена улучшенного варианта зеленого флюоресцентного белка GFP2 в структурной части *tk*-гена получали методом гомологичной рекомбинации между ДНК ВОВ штамма VVdGF2/6 с делецией гена *C11R* (Кочнева и др., 2013) и плазмидной ДНК pXJP5.2-GFP2 в цитоплазме клеток CV-1 и последующей селекции рекомбинантов в клетках Rat2 TK<sup>-</sup> с добавлением в культуральную среду бромдезоксипридина по методике, описанной ранее (Kochneva et al., 1994). Трансфекцию плазмидной ДНК проводили с использованием набора Lipofectamine™ с реагентом Plus (Life Technology) и культуральной среды Opti-MEM (Invitrogen). Для конструирования плазмиды pXJP5.2-GFP2 первоначально

была создана плаزمида рХJP5.2, которая обеспечивает встройку трансгенов в район *tk*-гена вируса за счет наличия в ней фрагмента ДНК ВОВ, соответствующего позициям нуклеотидов 80682–81277 депонированного нами в GenBank штамма Л-ИВП (Accession number KP233807), разделенного на левый (595 п. н., позиции 80682–81277) и правый (933 п. н., позиции 81307–82251) фланки с делецией 30 п. н. в центре *tk*-гена, в район которой введены природный промотор ВОВ р7.5К (276 п. н.) (Cochran et al., 1985) и полилинкер HindIII-EcoRI из плазмиды рUC19 (GenBank accession number M77789.2) для встройки трансгенов. Ген *GFP2* был выделен из коммерческой плазмиды рTagGFP2-C (Evrogen) и перенесен в полилинкер рХJP5.2 с получением плазмиды рХJP5.2-GFP2. Структура плазмиды подтверждена секвенированием.

Клонирование рекомбинантов проводили методом бляшек на монослое клеток CV-1 под твердым агаровым покрытием. Материал каждой изолированной бляшки помещали в пенициллиновые флаконы с монослоем клеток CV-1 и подращивали до образования ЦПЭ. Затем флаконы трижды замораживали/оттаивали, из 100 мкл криолизата выделяли ДНК с использованием набора ДНК-сорб-В (ИнтерЛабСервис) и анализировали методом ПЦР. Для скрининга рекомбинантов со встройкой гена *GFP2* была рассчитана и синтезирована пара праймеров:

TKVVsense 20 п. н. 5' cgatgtcttcgcagatgat 3'

TK2 internal antisense 20 п. н. 5' ttctgtgagcgtatggcaaa 3'.

Условия проведения ПЦР: 94° – 2 мин – 1 цикл, 94° – 10 с, 58° – 30 с – 29 циклов, 72° – 2,5 мин, 72° – 1 цикл.

Праймер TKVVsense расположен на вирусном геноме слева от фланкирующей последовательности плазмиды рХJP5.2-GMCSF и «привязывает» встройку гена *GFP2* непосредственно к вирусной ДНК. Праймер TK2 internal antisense лежит внутри правого фланкирующего фрагмента вирусного генома, который является общим для плазмиды рХJP5.2-GFP2 и вирусной ДНК. С использованием вышеуказанных праймеров с ДНК рекомбинантного вируса амплифицируется фрагмент размером 1962 п. н., а с ДНК исходного штамма VVdGF2/6 – фрагмент 716 п. н.

Отобранный рекомбинантный вариант VVdGF-GFP2 дважды реклонировали, чтобы очистить от возможных следовых примесей родительского вируса, и секвенировали район рекомбинации для подтверждения правильности структуры. Для оценки экспрессии гена *GFP2* монослой клеток CV-1 инфицировали рекомбинантным вирусом, инкубировали 48 ч, отмывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали изо-пропанолом. Сканирование бляшек проводили с помощью микроскопа «Axiovert» 40 CFL ZEISS с использованием люминесцентных светофильтров 09 (широкополосный для зеленой люминесценции). Далее вирус с подтвержденной структурой и экспрессией гена *GFP2* нарабатывали на клетках CV-1 и очищали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (25–40 %). Титр вируса определяли методом бляшек на монослое клеток CV-1, окрашенном фиксирующим раствором кристаллического фиолетового (2 г/л кристаллический фиолетовый, 50 мл/л формальдегид, 100 мл/л этанол, вода). Очищенный рекомбинантный штамм ВОВ VVdGF-GFP2 с титром 10<sup>9</sup> БОЕ/мл хранили до использования в расфасованном виде при –80 °С.

Мыши линии nude получены из филиала Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова НПП «Питомника лабораторных животных» (Московская область, г. Пущино). При выполнении исследований соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755). Животных содержали в боксированных помещениях с дополнительной фильтрацией и стерилизацией воздуха.

В работе использовали самок в возрасте 6–8 нед, весом 14–18 г. Суспензию клеток карциномы человека A431 (5 × 10<sup>6</sup> клеток/мышь в 100 мкл 0,9 % NaCl) вводили подкожно в правый и левый бочок мыши, ближе к бедру. Время формирования опухолей (ксенографтов) составляло 10–12 дней. «Лечение» начинали, когда объем опухолей достигал 100–150 мм<sup>3</sup>. Вирус вводили интратуморально в опухоль на левом бочке в дозе 10<sup>7</sup> БОЕ/мышь в 100 мкл 0,9 %-го NaCl. [В статье термин «опухоль» будет использован для обозначения инфицированного ксенографта, а неинфицированный ксенографт будет обозначаться термином «метастаз».] Мышам контрольной группы в опухоль вводили 100 мкл 0,9 %-го NaCl. Мониторинг состояния мышей осуществляли 2 раза в неделю, объем опухоли рассчитывали по формуле  $L \times W^2 \times 0,5$  (Yu et al., 2009). Общий период наблюдения составил 35 дней от начала «лечения». Двух мышей опытной группы через 12 дней после введения вируса анализировали в In-Vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Германия). Для анализа мышей усыпляли введением ксилазина (20 мг/кг в/м), затем делали рентгеновские снимки в разных позициях, с которыми совмещали УФО-изображения с использованием ПО MS FX PRO.

В период со вторых по 35-е сут каждые 2–3 сут умерщвляли по две мыши и забирали образцы инфицированной опухоли и метастаза, селезенку, печень, легкие, почки и кровь. 10 %-е гомогенаты органов и тканей (v/v) готовили в 0,9 %-м растворе NaCl, обрабатывали ультразвуком, центрифугировали и титровали методом бляшек на монослое клеток CV-1. Для микроскопического исследования использовали ксенографты, иссеченные в период с 4-х по 30-е сут после введения вируса.

Образцы для световой микроскопии обезживали стандартным методом с использованием гистологического автомата Sakura Tissue-Tek II (Sakura, Япония) и заливали в парафин. Сагиттальные срезы (3–4 мкм) опухоли и метастаза окрашивали гематоксилин-эозином, или по методу микро-Маллори (использовали готовый набор, Bio-Optica, Италия), затем заключали в среду Bio Mount (Bio-Optica, Италия). Парафиновые срезы анализировали в световом микроскопе Leica DM 2500 с цифровой камерой Leica DFC420C (Leica, Германия).

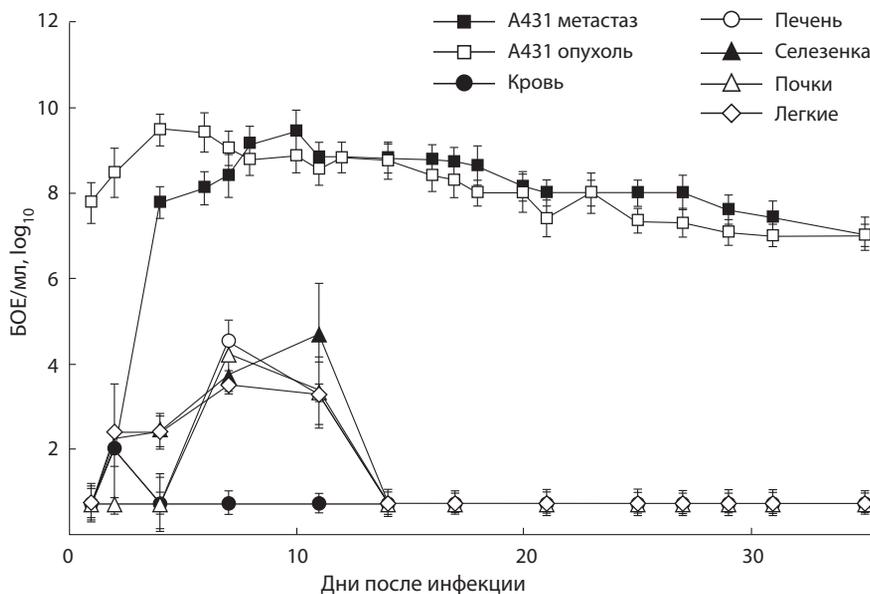
Для электронной микроскопии фиксированные в 4 %-м параформальдегиде ксенографты нарезали полосками толщиной 1–2 мм и постфиксировали в 1 %-м растворе четырехоксида осмия (SPI, США), обезживали стандартным методом и заливали в смесь эпон-аралдит (SPI, США). С блоков изготавливали полутонкие срезы, которые окрашивали Азуром 2, просматривали в световом микроскопе Leica DM 2500 (Лейка, Германия) и выбирали участки для прицельной заточки пирамид. С заточенных

пирамид на ультратоме Leica EM UC7 изготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали растворами цитрата свинца и уранилацетата (SPI, США). Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Джеол, Япония). Фотосъемку производили с помощью цифровой камеры бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

## Результаты

Поскольку ВОВ является инфекционным для человека, в ряде случаев после вакцинации, проводимой в качестве профилактической меры по борьбе с натуральной оспой, у вакцинированных людей наблюдались серьезные осложнения (Маренникова, Щелкунов, 1998). Риск для здоровья человека или животных, связанный с применением данного вируса в качестве лекарственного препарата, может быть снижен при использовании высокоаттенуированного (ослабленного) штамма вируса осповакцины. Такой высокоаттенуированный штамм VVdGF-GFP2 был сконструирован нами в данной работе. VVdGF-GFP2 представляет собой двойной рекомбинантный вариант ВОВ, российский штамм Л-ИВП, с делециями двух генов факторов вирулентности – *VGF* и *tk*. В район делеции *tk*-гена дополнительно был введен репортерный ген, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок GFP2.

Для оценки антиметастатической активности VVdGF-GFP2 при периферическом интратуморальном способе введения мы использовали пары удаленных друг от друга ксенографтов эпидермоидной карциномы человека А431, трансплантированные подкожно мышам линии nude. При таком способе трансплантации карцинома А431 развивается только в месте прививки у мышей и при введении вируса в один ксенографт («опухоль»), второй можно рассматривать как «метастаз» и использовать для оценки адресности распространения и онколитической активности вируса. На рис. 1 представлена динамика накопления рекомбинантного вируса в органах и тканях мышей. Как следует из этого рисунка, вирус регистрируется в крови уже через 24 ч после инфицирования, а через двое суток он



**Рис. 1.** Динамика накопления рекомбинантного штамма VVdGF-GFP2 в опухоли, метастазе, крови и органах мышей линии nude при интратуморальном введении.

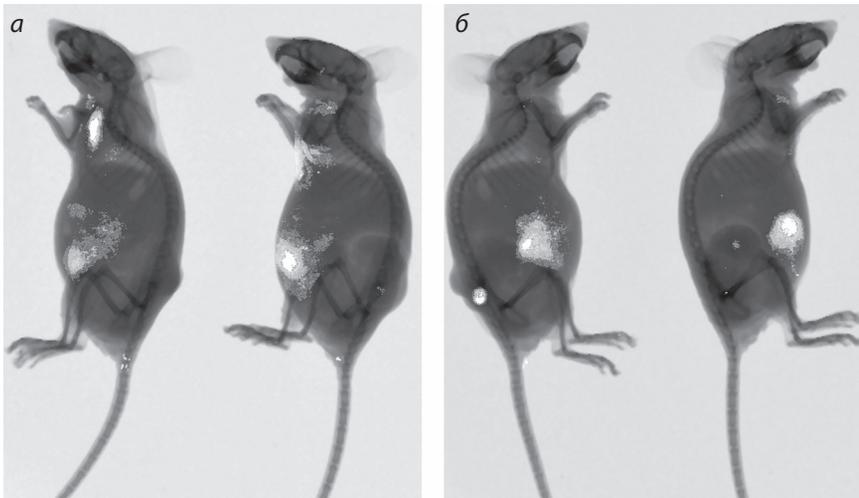
Нижняя линия – предел чувствительности метода (около 10 БОЕ/мл). Стандартное отклонение рассчитывали для  $p < 0,05$ .

выявляется в неинфицированном метастазе. Вирус также обнаруживается в селезенке, легких, печени и почках через 2–12 сут после инфицирования, однако к 14-м сут вирус регистрируется только в ксенографтах А431 и сохраняется там до 35 сут (период наблюдения). Через двое суток после инфицирования вирус в небольшом титре ( $10^2$  БОЕ/мл) также выявляется в крови, куда он, по-видимому, проникает вследствие повреждения тканей при уколе.

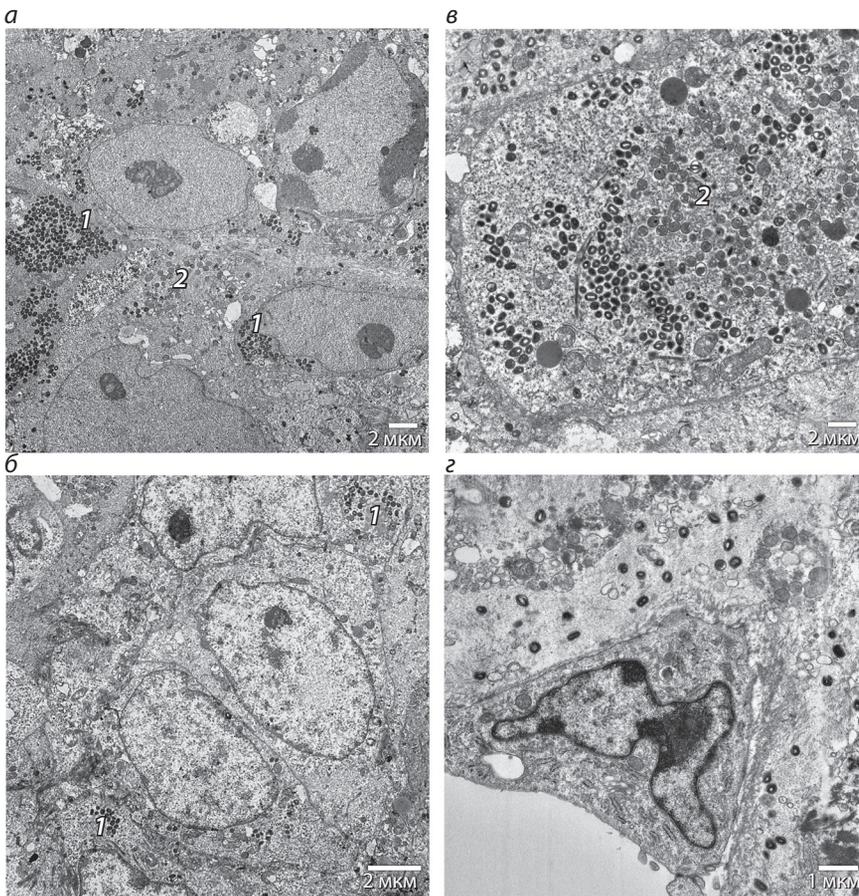
Наличие вируса в крови практически сразу после введения указывает на возможность его системного распространения по организму мыши, о чем свидетельствует и динамика накопления вируса в органах мышей, включая неинфицированный ксенографт А431. Вторичной вирусемии не наблюдается в течение всего периода исследования (35 дн.), что, очевидно, связано с низким уровнем репликации аттенуированного штамма VVdGF-GFP2 и быстрым клиренсом вируса из органов мышей, а также с его строгой внутриопухолевой локализацией (рис. 2).

Как следует из рис. 2, через 12 сут после инфицирования интенсивная флуоресценция наблюдается как в районе опухоли (рис. 2, а), так и метастаза (рис. 2, б). На рис. 2, а видно также небольшое свечение в районе легких мышей, что согласуется с данными рис. 1. Через 12 сут после инфицирования вирус регистрируется в легких в концентрации  $10^3$  БОЕ/мл 10 %-го гомогената органа, однако в дальнейшем накопления вируса не происходит, и через 15 сут он в легких не обнаруживается.

Исследование ультратонких срезов выявило репродукцию вируса в опухолевых клетках как инфицированных опухолей, так и неинфицированных метастазов (рис. 3, а, б). Рекомбинантный вирус VVdGF-GFP2 имеет типичные для ВОВ морфологические признаки репродукции: в цитоплазме инфицированных клеток регистрируются зернистая вироплазма, скопления незрелых вирусных частиц округлой формы и зрелых вирусных частиц овальной формы (рис. 3, в). На ультратонких срезах опухолей, иссеченных через 4 сут после инфицирования, отмечаются активная репродукция вируса и большое количество вирусных частиц в цитоплазме клеток, а также в межклеточном веществе и среди детрита. В то же время на ультратонких срезах метастазов морфологические признаки репродукции вируса регистрируются лишь через 12 сут после инфицирования. Некоторое расхождение с результатами биотитрования вируса, очевидно, обусловлено меньшей чувствительностью метода ультратон-



**Рис. 2.** УФО-изображения мышей, полученные с использованием In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker, Германия), через 12 сут после инфицирования.  
а – инфицированные вирусом VVdGF-GFP2 опухоли; б – неинфицированные метастазы.

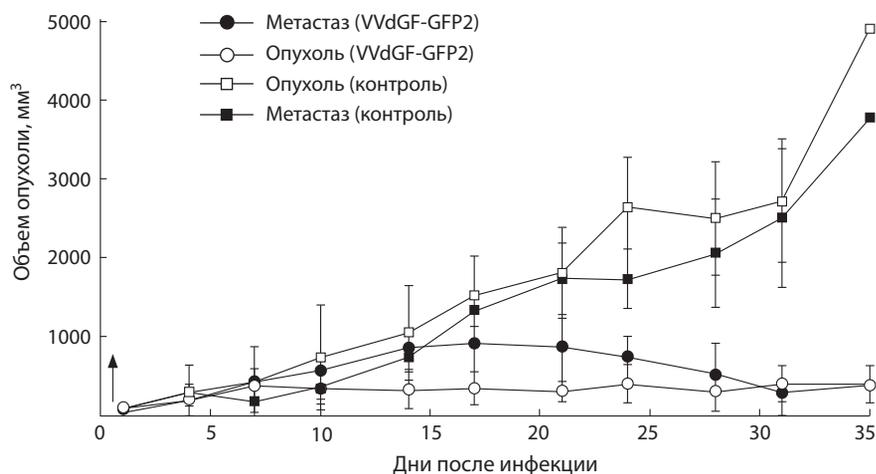


**Рис. 3.** Репродукция вируса в клетках опухоли (карцинома А431) (а) и метастаза (б, в), иссеченных через 4 и 12 сут после интратуморальной инъекции вируса соответственно; г – эндотелиоцит без признаков репродукции ВОВ.  
1 – зрелые вирусные частицы, 2 – незрелые. Ультратонкие срезы.

ких срезов. Рекомбинантный вирус VVdGF-GFP2 размножается только в опухолевых клетках. Морфологических признаков репродукции вируса в клетках стромы ксенографтов (фибробласты, эндотелиоциты) не выявлено. На рис. 3 представлен фрагмент эндотелиоцита инфицированной опухоли, морфологические признаки инфекции в нем отсутствуют.

Результаты измерения объема опухоли и метастаза, представленные на рис. 4, показывают, что вирус VVdGF-GFP2 вызывает значимое уменьшение размеров опухоли и метастаза, начиная с 25-х сут после инфицирования в сравнении с контролем. При этом динамика роста опухоли и метастаза несколько различается. Так, опухоль после небольшого увеличения в течение 7 сут стабилизируется в объеме на протяжении остального периода наблюдения (35 сут), в то время как метастаз продолжает увеличиваться до 17 сут, после чего отмечается уменьшение объема. К 30-м сут различия в динамике роста опухоли и метастаза практически нивелируются. Контрольная опухоль, в которую вводили 0,9 %-й NaCl, и соответствующий метастаз увеличивались в размере в течение всего периода наблюдения.

Светооптическое исследование ксенографтов, иссеченных в динамике эксперимента, показало, что введение рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 в один из них приводит к деструкции опухолевой ткани как в опухоли, так и в метастазе. Деструкция в опухоли происходит постепенно, в каждой последующей точке наблюдения, начиная с 4-х сут, на парафиновых срезах отмечаются увеличение очага деструкции и уменьшение участков визуально неповрежденной ткани. Деструктивные изменения опухолевой ткани в метастазах отмечаются через 6 сут после введения вируса, тогда как через 4 сут явных морфологических изменений не наблюдалось. Полная деструкция ткани опухоли регистрируется через 12 сут, а метастаза – через 20 сут после инъекции рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2: на парафиновых срезах опухолей, иссеченных в этот период времени и позднее, отсутствуют опухолевые клетки, сохраняющие целостность. Таким образом, по срав-



**Рис. 4.** Ингибирование роста ксенографтов карциномы человека A431 рекомбинантным штаммом VVdGF-GFP2.

Стрелкой указана точка начала измерения (1 сут). Метастаз (контроль) и опухоль (контроль) – метастаз и опухоль мышей, в опухоль которых вводили 0,9 %-й NaCl. Метастаз (VVdGF-GFP2) и опухоль (VVdGF-GFP2) – метастаз и опухоль мышей, леченных рекомбинантным вирусом. Стандартное отклонение рассчитывали для  $p < 0,05$ .

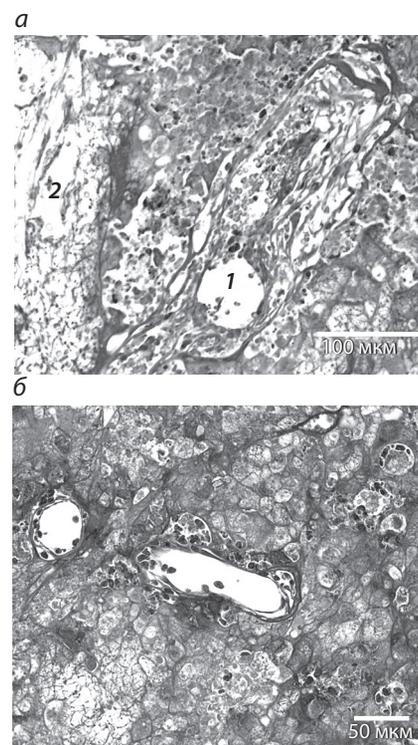
нению с опухолями, деструкция опухолевых клеток в метастазах происходит с некоторым временным сдвигом, что, очевидно, обусловлено более поздним попаданием вируса в ксенографт и меньшим его количеством.

Морфологические характеристики деструкции опухолевых узлов карциномы A431 при репродукции рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 аналогичны описанным нами ранее при введении штамма Л-ИВП BOB (Kochneva et al., 2014), но имеют ряд особенностей: выражен отек разрушенной ткани, детрит имеет преимущественно ячеистую структуру, в нем часто встречаются полости, что свидетельствует о накоплении жидкости в разрушенной ткани ксенографтов (рис. 5, а), стенки некоторых кровеносных сосудов расслаиваются, лейкоциты (в основном нейтрофилы) регистрируются между слоями в стенке сосудов и в периваскулярной ткани, в детрите встречаются отдельные небольшие скопления лейкоцитов (рис. 5, б).

Таким образом, однократное интратуморальное введение рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 приводит к деструкции и опухоли, и метастаза. Скорость деструкции опухолевой ткани при репродукции этого вируса заметно меньше, чем в случае штаммов Л-ИВП и VVdGF-Apo24S/2 (Kochneva et al., 2014). Так, полная деструкция опухоли отмечается через 8 сут после введения  $10^7$  БОЕ/мышь штамма VVdGF-Apo24S/2 или Л-ИВП, тогда как после введения той же дозы вируса VVdGF-GFP2 полная деструкция наблюдается через 12 сут. Различия, очевидно, связаны с большей аттенуацией вируса VVdGF-GFP2 в сравнении со штаммом VVdGF-Apo24S/2, который имеет делецию только одного гена *VGF*. Морфологические параметры деструкции ксенографтов после введения рекомбинантного вируса VVdGF-GFP2 существенно не отличаются от таковых после введения рекомбинантного штамма VVdGF-Apo24S/2 или исходного штамма Л-ИВП. Характерными признаками являются более выраженные отек и лейкоцитарная инфильтрация разрушенной опухолевой ткани.

## Обсуждение

Для оценки онколитической активности в работе был сконструирован рекомбинантный вирус VVdGF-GFP2, штамм BOB Л-ИВП (GenBank KP233807), с делецией *VGF* и *tk*-генов (фенотип ТК-VGF<sup>-</sup>). Известно, что удаление именно этих генов способствует значительной аттенуации вируса и усилению адресности его онколитической активности (McCart et al., 2007). Для визуализации накопления вируса в клетках опухолевого узла и метастаза в *tk*-ген двойного



**Рис. 5.** Особенности деструкции опухолевой ткани ксенографтов карциномы A431.

а – кровеносный сосуд со слоистой стенкой: 1 – просвет сосуда, 2 – полость в детрите; б – выход лейкоцитов из кровеносного русла. Окраска по методу пикро-Маллори.

делеционного варианта Л-ИВП был введен репортерный ген зеленого флюоресцентного белка GFP2 (фенотип GFP<sup>+</sup>), который обеспечивал свечение инфицированных клеток под микроскопом «Axiovert» 40 CFL ZEISS с использованием люминесцентных светофильтров (*in vitro*) и в In-Vivo Multispectral Imaging System (Bruker) (*in vivo*).

Онколитическую активность вируса изучали на модели двух удаленных друг от друга ксенографтов эпидермоидной карциномы человека A431, трансплантированных подкожно мышам линии nude. Вирус вводили однократно интратуморально в один из ксенографтов, который моделировал первичный опухолевый узел. Второй ксенографт карциномы A431 моделировал метастаз.

Проведенные эксперименты показали, что при внутриопухолевом периферическом введении ТК-GFP<sup>+</sup>VGF<sup>-</sup> вирус в первые же сутки, возможно, вследствие механического поврежде-

тканей, выходит в кровь и инфицирует удаленный опухолевый узел (метастаз), а также селезенку и легкие. На 4-е сут и далее на протяжении всего исследованного периода вирус в крови не регистрируется, что свидетельствует об отсутствии вторичной виремии. В этот же период вирус начинает регистрироваться в почках и печени, однако на 14-е сут после инфицирования ТК<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>VGF<sup>-</sup> вирус выявляется только в опухоли и метастазе.

Рекомбинантный вирус VVdGF-GFP2 обладает высокой репродуктивной активностью в опухолевых клетках A431, которая в этом случае не отличается от таковой исходного штамма Л-ИВП (Kochneva et al., 2014). Важно, что этот вирус способен очень быстро, уже на 2-е сут после введения, достигать отдаленные от первичного места введения опухолевые узлы (метастазы), инфицировать их и локально реплицироваться в них до высоких концентраций (10<sup>9</sup> БОЕ/мл на 8-е сут), разрушая при этом клетки опухоли, как следует из данных микроскопического анализа. Морфологических признаков репродукции вируса в клетках стромы ксенографтов не выявлено. Строгая внутриопухолевая локализация вируса подтверждается также анализом мышей в In-Vivo Multispectral Imaging System, в котором выявлено интенсивное свечение, индуцированное экспрессируемым в составе вируса GFP2, в районе опухоли и метастаза.

Полная деструкция ткани опухоли регистрировалась через 12 сут, а метастаза – через 20 сут после инъекции VVdGF-GFP2. В обоих случаях деструкция сопровождалась выраженным отеком и лейкоцитарной инфильтрацией ксенографтов. Рекомбинантный вирус индуцировал значимое уменьшение размеров опухоли и метастаза; к окончанию эксперимента (35-е сут) размер ксенографтов контрольных мышей в 10 раз превышал аналогичный параметр леченных (5 000 против 500 мм<sup>3</sup>).

Таким образом, на примере рекомбинантного штамма VVdGF-GFP2 и двух модельных ксенографтов карциномы человека A431, привитых мышам линии nude, мы показали, что аттенуированный ВОВ даже при однократном локальном введении не только способен адресно разрушать ткань первичного опухолевого узла, но также обладает отчетливым антиметастатическим действием, что подтверждает его высокую онколитическую активность.

## Благодарности

Микроскопические исследования поддержаны грантом РФФИ № 13-04-01076 «Механизмы селективной репродукции вируса осповакцины в опухолевых клетках»; молекулярно-биологические работы по конструированию рекомбинантного вируса осповакцины финансированы Российским грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-4713.2014.4; все вирусологические работы, включая эксперименты с мышами линии nude проведены при поддержке Минобрнауки России (ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.», Соглашение № 14.604.21.0057 от 27.06.2014 г. (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0057).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Кочнева Г.В., Бабкина И.Н., Лупан Т.А., Гражданцева А.А., Юдин П.В., Сиволобова Г.Ф., Швалов А.Н., Попов Е.Г., Бабкин И.В., Нетесов С.В., Чумаков П.М. Апоптин усиливает онколитическую активность вируса осповакцины *in vitro*. Молекуляр. биология. 2013;47(5):842-852.
- Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Юдина К.В., Бабкин И.В., Чумаков П.М., Нетесов С.В. Онколитические поксвирусы. Молекуляр. генет., микробиол. и вирусология. 2012;1:8-15.
- Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М., 1998.
- Юнусова А.Ю., Зонов Е.В., Кочнева Г.В., Рябчикова Е.И. Морфология ксенографтов карциномы A431 человека у мышей линии nude. Вестн. НГУ. 2014;12(3):42-48.
- Breitbach C., Arulanandam R., De Silva N., Thorne S., Thorne S., Daneshmand M., Moon A., Burke J., Hwang T. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res.* 2013;73(4):1265-1275.
- Breitbach C., Burke J., Jonker D., Stephenson J., Haas A., Chow L., Nieva J., Hwang T., Moon A., Thorne S., Pelusio A., LeBoeuf F., Burns J., Evgin L., De Silva N., Cvancic S., Robertson T., Je J., Lee Y., Parato K., Diallo J., Fenster A., Daneshmand M., Bell J., Kirn D. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature.* 2011;477:99-102.
- Breitbach C.J., Thorne S.H., Bell J.C., Kirn D.H. Targeted and armed oncolytic poxviruses for cancer: the lead example of JX-594. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012;3:1768-1772.
- Cochran M.A., Puckett C., Moss B. *In vitro* mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals. *J. Virol.* 1985;54(1):30-37.
- Haddad D., Chen N., Zhang Q., Chen C.-H., Yu Y.A., Gonzalez L., Aguilar J., Li P., Wong J., Szalay A.A., Fong Y. A novel genetically modified oncolytic vaccinia virus in experimental models is effective against a wide range of human cancers. *Ann. Surg. Oncol.* 2012;19:S665-S674.
- Kochneva G., Zonov E., Grazhdantseva A., Unusova A., Sivolobova G., Popov E., Taranov O., Netesov S., Chumakov P., Ryabchikova E. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression. *Oncotarget.* 2014;5(22):11269-11282.
- Kochneva G.V., Urmanov I.H., Ryabchikova E.I., Streltsov V.V., Serpinsky O.I. Fine mechanisms of ectromelia virus thymidine kinase-negative mutants avirulence. *Virus Res.* 1994;34:49-61.
- McCart A., Bartlett D., Moss B. Combined growth factor-deleted and thymidine kinase-deleted vaccinia virus vector. US Patent. 2007. N 7208313.
- Thorne S.H., Hwang T.H., O’Gorman B.E., Bartlett D.L., Sei S., Adiat F., Brown C., Werier J., Jo J.H., Lee D.E., Wang Y., Bell J., Kirn D.H. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest.* 2007;117:3350-3358.
- Weibel S., Raab V., Yu Y.A., Worschech A., Wang E., Marincola F.M., Szalay A.A. Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection. *BMC Cancer.* 2011;11:68-74.
- Yu Z., Li S., Brader P., Chen N., Yu Y.A., Zhang Q., Szalay A.A., Fong Y., Wong R.J. Oncolytic vaccinia therapy of squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer.* 2009;8:45-53.