

УДК 616-006.484.04

Сигнальные пути, определяющие эффективность терапии глиобластомы вирусом осповакцины

Н. С. Васильева*, А. Б. Агеенко, В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: nataly_vas@bk.ru

Поступила в редакцию 29.10.2021

Принята к печати 16.03.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11623

РЕФЕРАТ Резистентность глиобластомы к существующим методам терапии лимитирует выживаемость и повышение качества жизни пациентов с данным диагнозом. Для разработки эффективных способов лечения глиобластомы необходимо знать механизмы, определяющие устойчивость опухоли к терапевтическим агентам. Виротерапия относится к наиболее активно развивающимся подходам к лечению злокачественных новообразований, в том числе глиобластом. Ранее мы показали, что рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact обладает цитотоксической активностью *in vitro* и противоопухолевой эффективностью *in vivo* в отношении глиобластомы человека. Однако исследованные культуры клеток глиобластомы обладали разной чувствительностью к онкотоксическому действию вируса. С помощью метода проточной цитометрии мы определили представленность поверхностных маркеров стволовых опухолевых клеток на клетках глиобластомы с различной чувствительностью к VV-GMCSF-Lact, а также методом вестерн-блот-анализа оценили уровень белков, способных влиять на проникновение вируса в клетки и на эффективность вирусной инфекции. Мы показали, что в культурах клеток, более чувствительных к VV-GMCSF-Lact, регистрируется большее количество клеток, несущих маркеры стволовых опухолевых клеток, и более низкий уровень активированной киназы Akt. Akt, вероятно, ингибирует апоптоз, индуцируемый лактаптинном в клетках, устойчивых к вирусу. Таким образом, можно предположить, что чувствительность клеток глиобластомы к онкотоксическому действию VV-GMCSF-Lact определяется характером и степенью нарушений процессов регуляции гибели клеток различных культур. Дополнительное изучение факторов, влияющих на устойчивость глиобластомы к виротерапии, позволит проверить эту гипотезу и выявить мишени для противоопухолевой терапии, комбинированной с VV-GMCSF-Lact.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глиобластома, механизмы резистентности глиобластомы, онколитические вирусы, стволовые опухолевые клетки, VV-GMCSF-Lact.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СОК – стволовые опухолевые клетки; Akt – серин/треонинкиназа 1; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; PAK1 – p21-активированная киназа; MEM – Minimum Essential Medium (среда Игла); FBS – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота; CD15 (Lewis X) – 3-фукозил-N-ацетиллактозамин; CD171 – молекула адгезии нейтральных клеток L1 (L1CAM); PE – фикоэритрин; IC₅₀ – концентрация вируса, вызывающая гибель 50% клеток; CD133 – промнин-1; CD44 – интегральный клеточный гликопротеин; VACV – вирус осповакцины.

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома – наиболее злокачественная опухоль центральной нервной системы – характеризуется низкой выживаемостью пациентов. Стандартная терапия глиобластомы, включающая максимально возможную резекцию опухоли с последующей радио- и/или химиотерапией, не позволяет улучшить качество жизни и увеличить выживаемость пациентов с данным диагнозом.

Основную проблему для эффективного лечения глиобластомы представляет резистентность опухоли к существующим методам терапии. На сегодняшний день научно-медицинское сообщество разрабатывает и продвигает различные подходы к терапии глиобластомы, основанные на ингибировании таргетных молекул, иммунотерапии и других методах. Активно развивается такой подход к иммунотерапии опухолей, в том числе глиом,

как терапия с помощью онколитических вирусов [1].

Ранее коллективом авторов ИХБФМ СО РАН и ГНЦ ВВ «Вектор» был создан рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact. VV-GMCSF-Lact содержит делеции фрагментов генов тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены гены ГМ-КСФ и онкотоксического белка лактапина. Делеция этих генов снижает вирулентность вируса по отношению к здоровым клеткам и значительно повышает его селективность по отношению к онкотрансформированным. Экспрессия ГМ-КСФ способствует развитию противоопухолевого иммунного ответа, в то время как экспрессия лактапина, фрагмента каппа-казеина молока человека, индуцирует апоптотическую гибель опухолевых клеток. Ранее было показано, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток человека различного гистогенеза *in vitro* и значительной противоопухолевой эффективностью в отношении рака молочной железы и глиобластомы человека *in vivo* [2, 3].

Однако клетки различных культур глиобластомы как иммортализованных, так и полученных из образцов опухолей пациентов (персонализированные культуры) обладают разной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact. Известно, что глиобластомы характеризуются межопухолевой и внутриопухолевой гетерогенностью. Некоторые молекулярные подтипы глиобластомы, например proneйральный, более чувствительны к радиотерапии и химиотерапии темозоламидом, однако определенные типы этого новообразования, в частности мезенхимальный молекулярный подтип, устойчивы к стандартной терапии [4, 5]. При этом вопрос о формировании резистентности опухолевых клеток к вирусной терапии остается открытым [6, 7].

Вирус осповакцины, на основе которого создан препарат VV-GMCSF-Lact, способен проникать в клетки-мишени путем слияния с клеточной мембраной либо (при низких значениях pH) с мембранами эндосом [8, 9]. Показано также, что фосфатидилсерин, представленный на мембране вирусных частиц, позволяет вирусу проникать в клетку посредством макропиноцитоза за счет мимикрии под апоптотические тельца [10]. Эти способы проникновения требуют перестройки цитоскелета клетки-мишени и, соответственно, их эффективность может зависеть от состояния различных клеточных сигнальных путей, таких, например, как путь PI3K/Akt. Кроме того, на всех этапах макропиноцитоза необходима p21-активированная киназа RAK1, которая участвует в реорганизации цитоскелета и динамике микротрубочек [11].

В данной работе мы исследовали факторы, обуславливающие эффективность цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact в отношении клеток культур глиобластомы, обладающих разной чувствительностью к действию вируса. Мы оценили представленность маркеров стволовых опухолевых клеток (СОК) глиобластомы в клетках иммортализованных линий U87 MG и U343 MG и персонализированных культур BR1.20 и BR3.20, а также определили уровень белков, способных влиять на эффективность вирусной инфекции в опухолевых клетках – элементов сигнального пути PI3K/Akt и RAK1. Показано, что в культурах клеток глиобластомы, чувствительных к онкотоксическому действию VV-GMCSF-Lact, детектируется большее количество клеток, несущих маркеры СОК, а также более низкий (по сравнению с устойчивыми клетками) уровень активированной протеинкиназы Akt, способной ингибировать апоптоз, индуцируемый лактапином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток глиобластомы

Культуры клеток глиобластомы человека U87 MG, U343 MG, BR1.20 и BR3.20 получены из коллекции культур клеток ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Клетки иммортализованных культур U87 MG и U343 MG культивировали в среде альфа-MEM с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамин и раствора антибиотиков-антимикотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.25 мкг/мл амфотерицина).

Клетки персонализированных культур BR1.20 и BR3.20 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS, 4 mM L-глутамин и раствора антибиотиков-антимикотиков (200 ед./мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.5 мкг/мл амфотерицина).

Все культуры содержали в CO₂-инкубаторе при температуре 37.0 ± 1.0°C в атмосфере 5.0 ± 0.5% CO₂.

Проточная цитометрия

Клетки, достигшие 60–80% монослоя, собирали с культурального пластика и инкубировали с моноклональными антителами к CD15 человека, конъюгированными с Alexa Fluor 647 (R&D Systems, США), и с моноклональными антителами к CD171 человека, конъюгированными с PE (R&D Systems), согласно протоколу производителя. Анализ проводили с использованием проточного цитометра FACSCantoII (BD Biosciences, США). Данные ана-

лизировали с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences).

Вестерн-блот-анализ

Уровни белков p85α и p110α, pAkt^{Ser473}, pAkt^{Thr308} и pRAK1^{Ser199/204} до и после воздействия вируса (через 0,5, 1, 2, 6 и 12 ч) оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа. Множественность инфекции составляла 1 БОЕ/клетку.

Клетки инкубировали с вирусом, после этого получали клеточные лизаты с использованием RIPA-буфера (1% NP40, 150 мМ NaCl, 0.1% SDS, 50 мМ Трис-НСl, рН 7.4) в присутствии ингибиторов протеаз и фосфатаз (Pierce Phosphatase Inhibitors Mini Tablets, Thermo Scientific, США), cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию белка в полученных лизатах определяли с использованием коммерческого набора Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific) согласно протоколу производителя. Белки разделяли с помощью электрофореза в денатурирующем 10% полиакриламидном геле с использованием камеры для вертикального электрофореза. «Мокрый» перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 мкм) осуществляли в буфере для переноса NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen, США) при постоянном токе 400 мА в течение 1 ч. Обработку мембран антителами осуществляли с использованием инкубатора для нитроцеллюлозной мембраны IBind Western Device (Bio-Rad, США). Белки детектировали с использованием набора реагентов Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen) и системы для хемилюминесцентной детекции Amersham™ Imager 600. Для нормирования мембраны окрашивали рекомбинантными моноклональными антителами кролика к β-актину.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Популяция CD15 и CD171 положительных клеток в культурах U87 MG, U343 MG, BR1.20 и BR3.20 глиобластомы человека

Ранее нами было показано, что рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact с делециями фрагментов генов вирусных тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены гены ГМ-КСФ человека и онкотоксического белка лактапина соответственно, обладает высокой цитотоксической активностью и противоопухолевой эффективностью в отношении клеток как иммортализованных культур глиобластомы человека, так и в отношении клеток культур, полученных из образцов опухолей пациентов. При этом клет-

Таблица 1. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиомы

Культура клеток	IC ₅₀ *, БОЕ/кл
U87 MG	0.1
U343 MG	0.06
BR1.20	0.006
BR3.20	0.02

*IC₅₀ – концентрация вируса, вызывающая гибель 50% клеток.

ки исследуемых культур обладали разной чувствительностью к действию вируса [3].

В данной работе мы исследовали некоторые факторы, способные влиять на эффективность воздействия вируса на опухолевые клетки. С этой целью использовали иммортализованные линии глиобластомы U87 MG и U343 MG, а также культуры, полученные из образцов опухолей пациентов (персонализированные культуры) BR1.20 и BR3.20. Исследуемые клетки обладают разной чувствительностью к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact (табл. 1).

Различия в цитотоксическом эффекте вируса на клетки могут быть связаны, в первую очередь, с различиями в происхождении исследуемых культур клеток. Известно, что глиобластомы представляют гетерогенную группу злокачественных образований с зачастую несхожим ответом на терапию [12]. Кроме того, новообразования этого типа характеризуются внутриопухолевыми отличиями на молекулярном уровне и сложной организацией на клеточном [13]. Согласно иерархической модели, СОК глиобластомы находятся на вершине иерархии и вносят значительный вклад в устойчивость опухоли к терапии [14]. Например, сигнальный путь Notch, играющий важную роль в поддержании фенотипа СОК, вносит вклад в формирование резистентности этих клеток к радиотерапии посредством активации путей PI3K/Akt и Vcl-2, важных регуляторов роста и выживания клеток [15]. Ранее мы показали, что культуры глиобластомы, характеризующиеся большей чувствительностью к VV-GMCSF-Lact, содержат больше клеток CD133+ и CD133+/CD44+ (рис. 1) [3].

С помощью проточной цитометрии мы оценили представленность других маркеров СОК: CD15 и CD171 [16, 17] в клетках культур U87 MG, U343 MG, BR1.20 и BR3.20, обладающих различной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact (рис. 2).

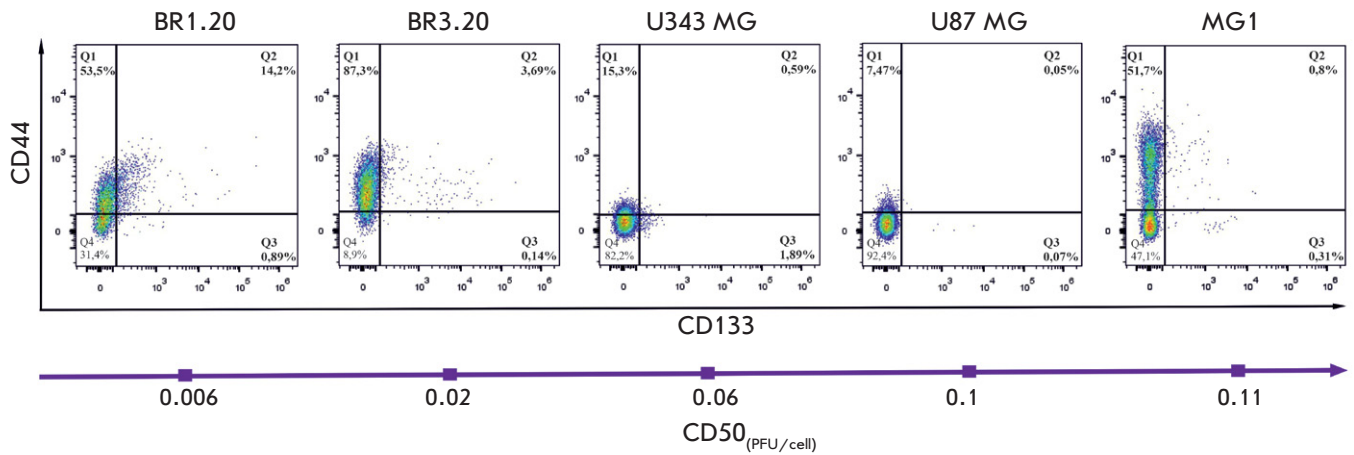


Рис. 1. Профили экспрессии CD133 и CD44 и их совместная экспрессия в культурах клеток MG1, BR1.20, BR3.20, U343 MG и U87 MG. Суспензии клеток инкубировали с PE-конъюгированными анти-CD133 и APC-конъюгированными анти-CD44-антителами и анализировали с помощью проточной цитометрии. Верхние квадранты (Q1, Q2) – популяция CD44-положительных клеток; правые квадранты (Q2, Q3) – популяция CD133-положительных клеток. Клетки, положительные по обоим маркерам, представлены в правом верхнем квадранте (Q2). Фиолетовой стрелкой обозначено снижение чувствительности клеток исследуемых культур к VV-GMCSF-Lact [3]

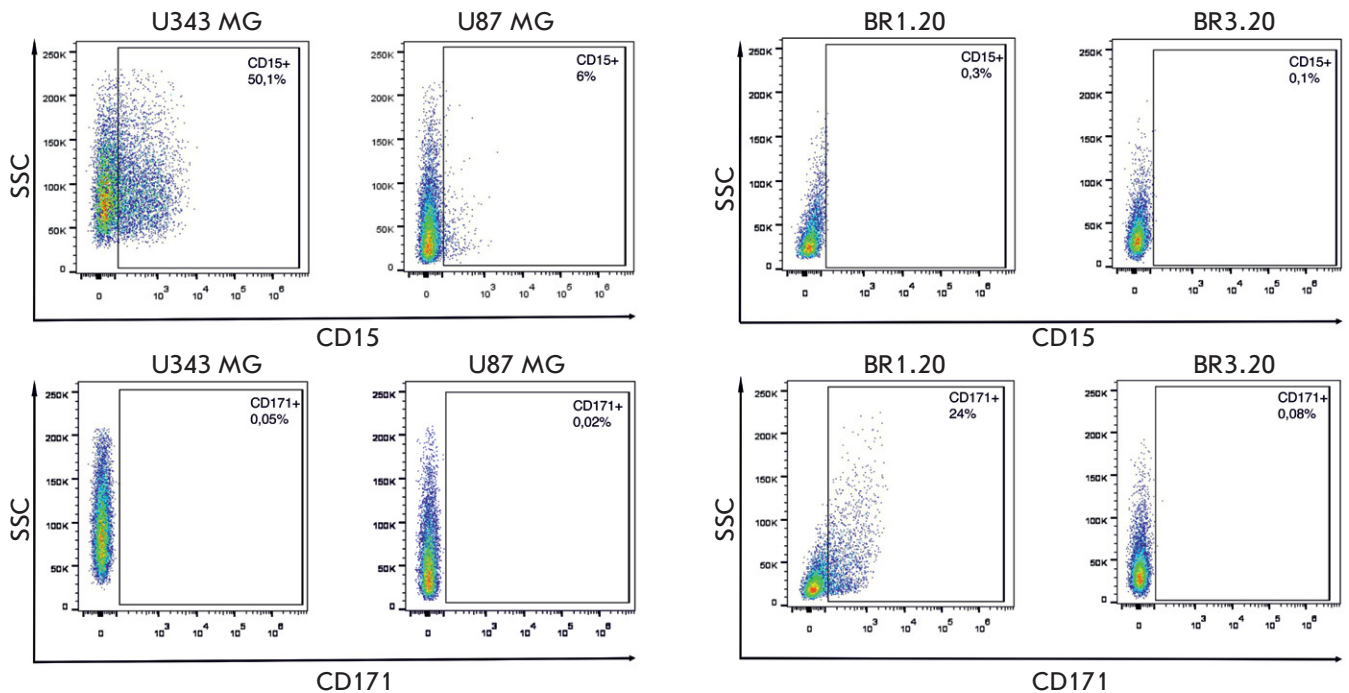


Рис. 2. Представленность маркеров CD15 и CD171 в культурах клеток U87 MG, U343 MG, BR1.20 и BR3.20. Суспензии клеток инкубировали с PE-конъюгированными анти-CD171 и FITC-конъюгированными анти-CD15-антителами и анализировали с помощью проточной цитометрии

Маркер CD15, также известный как SSEA-1, или Lewis X, – это углеводная молекула адгезии, широко представленная на многих типах плюрипотентных стволовых клеток [18]. В нашем исследовании CD15-положительные клетки представлены в иммортализованных культурах U87 MG и U343 MG в количестве 6 и 50.1% соответственно. При этом ко-

личество CD133-положительных клеток в этих культурах было либо значительно ниже, либо такие клетки не детектировались [3]. В 2009 году M. Son и соавт. показали, что культуры клеток глиобластомы, полученные из образцов опухолей пациентов, могут не содержать CD133-положительных стволовых опухолевых клеток. Однако в этих культурах представ-

лены клетки со свойствами, сходными со свойствами стволовых клеток и обладающие опухолевым потенциалом при трансплантации иммунодефицитным мышам [19]. Таким образом, маркер CD15 можно рассматривать как альтернативный вариант CD133 для выделения и характеристики стволовых клеток глиобластомы.

Маркер CD171, или L1CAM, относится к семейству иммуноглобулин-подобных молекул клеточной адгезии, он играет важную роль в развитии нейральных клеток, выживаемости и миграции опухолевых клеток [20, 21]. Известно, что в клетках глиобластомы CD171 опосредует развитие радио- и химиорезистентности [22, 23]. Стоит отметить, что культура BR1.20, единственная из исследуемых культур, содержит CD171-позитивные клетки.

Таким образом, наиболее чувствительной к действию VV-GMCSF-Lact оказалась культура BR1.20, клетки которой отличаются более высоким содержанием не только маркеров CD133 и CD44, но и CD171, который участвует в поддержании выживания и клоногенности CD133-позитивных СОК за счет позитивной регуляции Olig2, ведущей к снижению экспрессии опухолевого супрессора p21 [24]. CD133, известный как промнин-1, играет важную роль в клеточном росте, пролиферации и патофизиологии опухолей [25]. Также показано, что популяция CD133+ клеток устойчива к радиотерапии за счет более эффективной работы системы репарации [26]. Фосфорилирование цитоплазматического домена CD133 приводит к его связыванию с p85, регуляторной субъединицей PI3K, и последующей активации сигнального пути PI3K/Akt [27]. Согласно опубликованным данным, активация сигнального пути PI3K/Akt является одним из ведущих процессов, обуславливающих эффективность проникновения вирусных частиц VACV в клетку и репликацию вируса на ранних этапах инфекции [28–30].

Уровни белков p85α и p110α, pAkt^{Ser473}, pAkt^{Thr308} и pPAK1^{Ser199/204} в клетках U87 MG и U343 MG до и после воздействия вирусного препарата

Вирус осповакцины способен проникать в клетку-хозяина как посредством полного слияния мембран и pH-зависимого эндоцитоза, так и по механизму макропиноцитоза за счет взаимодействия остатков фосфатидилсерина на вирусной мембране с рецепторами, ассоциированными (сопряженными) с G-белком клетки, что ведет к активации ниже лежащих сигнальных путей, таких, как PI3K/Akt, реорганизации цитоскелета клетки-хозяина и последующему проникновению вируса внутрь клетки. Показано, что ингибирование PI3K приводит к снижению количества проникших в клетку вирионов

[10]. Кроме того, на всех стадиях макропиноцитоза задействована P21-активированная киназа PAK1, перемещение которой на плазматическую мембрану приводит к активации множества эффекторов, необходимых для образования макропиносом [11].

Исследование уровня белков p85α и p110α (регуляторной и каталитической субъединиц PI3K) в клетках U87 MG и U343 MG показало, что относительный уровень этих белков как в контрольной точке, так и при увеличении времени инкубации с вирусом выше в клетках U343 MG, более чувствительных к действию VV-GMCSF-Lact (рис. 3, 4). Более высокий уровень p85α и p110α, вероятно, обуславливает образование большего количества гетеродимеров PI3K и, соответственно, активацию сигнального каскада PI3K/Akt, который (согласно опубликованным данным) участвует не только в проникновении вируса осповакцины в клетку, но и необходим на ранних стадиях репликации вируса [28]. Кроме того, наиболее чувствительные к вирусу клетки U343 MG имеют более высокий уровень pAkt^{Ser473} и pPAK1^{Ser199/204} (аутофосфорилирование PAK1 по данным сайтам предотвращает переход киназы в неактивную конформацию [31]). При этом с увеличением времени инкубации клеток обеих линий с вирусом уровни данных белков возрастали. Показано, что PAK1 участвует в реорганизации цитоскелета и динамике микротрубочек, опосредуя блеббинг клеточной мембраны [32], а ингибирование этого фермента снижает эффективность инфицирования клеток вирусом осповакцины [10]. Фосфорилирование Akt по серину в положении 473 осуществляет комплекс mTORC2 [33]. Известно, что консервативный белок поксвируса F17, секвестрируя Raptor и Rictor, нарушает регуляцию mTOR, что ведет к сверхактивации комплекса mTORC2 [34]. Таким образом, можно предположить, что более высокий уровень pAkt^{Ser473} в чувствительных к VV-GMCSF-Lact клетках U343 MG свидетельствует о более эффективном проникновении вируса в клетки, опосредованном PI3K и PAK1. Однако стоит отметить, что для полной активации Akt необходимо ее фосфорилирование по остатку треонина в положении 308. При взаимодействии остатков фосфатидилсерина, локализованных на вирусной мембране, с рецепторами, ассоциированными (сопряженными) с G-белком клетки-хозяина, формируются гетеродимеры p85-p110 (PI3K). Впоследствии PI3K превращает фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PIP2) в фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3). После связывания плекстрин-подобного домена Akt с PIP3 Akt фосфорилируется по Thr308 киназой PDK1 [35, 36]. Уровень фосфорилированной Akt был выше в клетках U87 MG, более устойчивых к дей-

ствию VV-GMCSF-Lact как в контрольной точке, так и при увеличении времени инкубации с вирусом, что может свидетельствовать о более высоком уровне полностью активированной Akt в данных клетках. Фосфорилированная по обоим сайтам Akt активирует комплекс mTORC1 как косвенно, через инактивацию TSC2, так и напрямую, посредством фосфорилирования PRAS40 [37]. Эти процессы приводят к увеличению синтеза белка и блокированию системы апоптоза. Akt регулирует апоптотические процессы, ингибируя каспазы-9 и -3 [38]. При этом лактаптин, экспрессируемый VV-GMCSF-Lact, индуцирует апоптотическую гибель клеток по митохондриальному пути. Показано, что инкубация клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с рекомбинантным аналогом лактапина

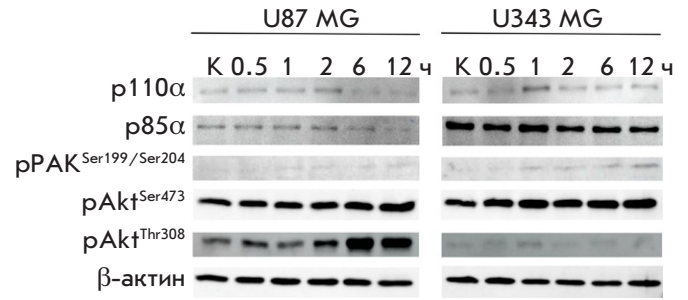


Рис. 3. Содержание белков p85α и p110α, pAkt^{Ser473}, pAkt^{Thr308} и pPAK1^{Ser199/204} в клетках иммортализованных культур U87 MG и U343 MG. Вестерн-блот. Дорожки: К – лизаты контрольных клеток; 0,5, 1, 2, 6 и 12 ч – лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение различных промежутков времени

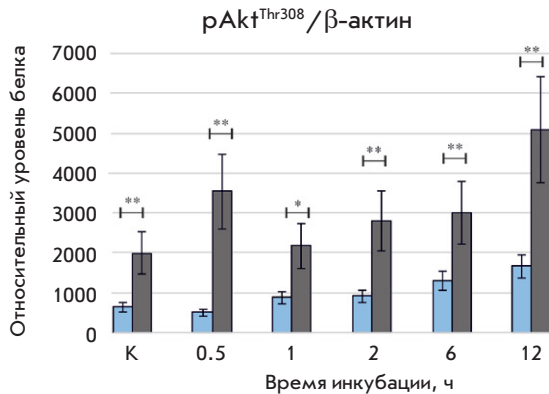
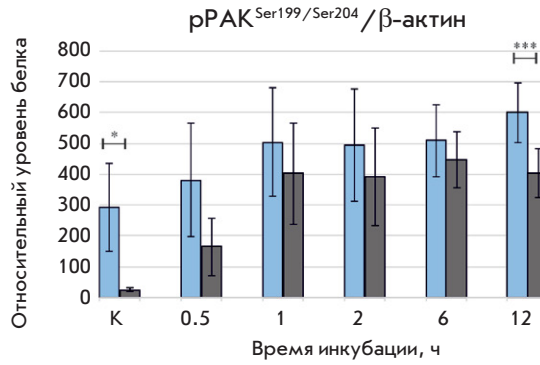
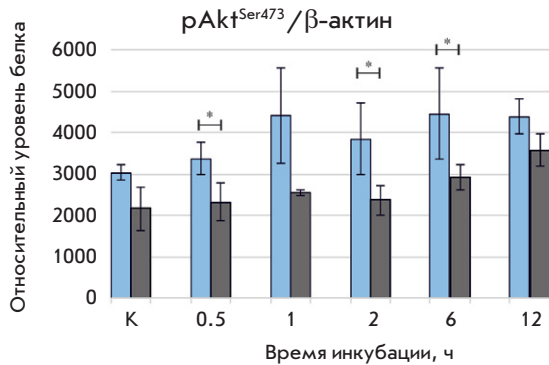
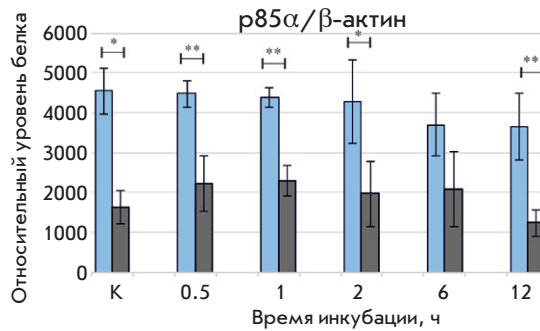
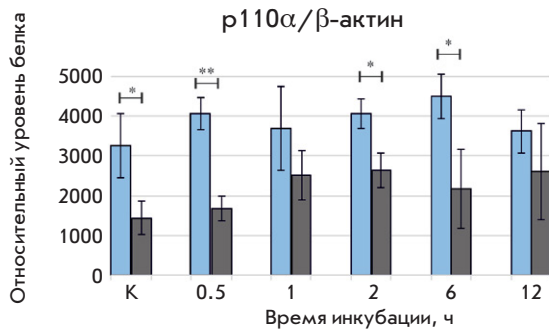


Рис. 4. Относительные уровни белков p85α и p110α, pAkt^{Ser473}, pAkt^{Thr308} и pPAK1^{Ser199/204} в клетках иммортализованных культур U87 MG и U343 MG до и после инкубации с VV-GMCSF-Lact (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001)

RL2 приводит к увеличению в них уровня активной формы каспазы-9 [39]. Таким образом, устойчивость клеток глиобластомы U87 MG к действию VV-GMCSF-Lact может быть обусловлена активностью киназы Akt, которая ингибирует апоптоз, индуцируемый лактапином.

Уровни белков p85α и p110α, pAkt^{Ser473}, pAkt^{Thr308} и pPAK1^{Ser199/204} в клетках BR1.20 и BR3.20

до и после воздействия вирусного препарата

Уровни белков p85α и p110α в клетках BR1.20 и BR3.20 изменялись в зависимости от продолжительности инкубации с вирусом (рис. 5, 6). В клетках BR1.20 уровень p85α незначительно повышался к 12 ч инкубации, в клетках BR3.20 – повышался к 6 ч инкубации, а затем снижался к 12 ч. Уровень p110α в клетках BR1.20 в среднем оставался на одном уровне в течение 12 ч инкубации, а в клетках BR3.20 снижался к 12 ч. При этом в более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact клетках BR3.20

уровень p110α в контрольной точке (клетки без воздействия вируса) был выше. Уровень PAK1 в более чувствительных клетках BR1.20 повышался

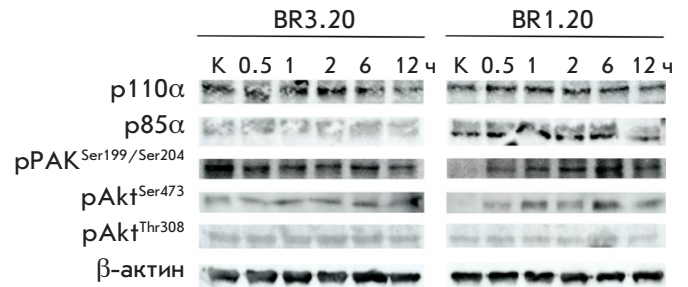


Рис. 5. Анализ содержания белков p85α и p110α, pAkt^{Ser473}, pAkt^{Thr308} и pPAK1^{Ser199/204} в клетках персонализированных культур BR1.20 и BR3.20. Вестерн-блот. Дорожки: К – лизаты контрольных клеток; 0.5, 1, 2, 6 и 12 ч – лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение различных промежутков времени

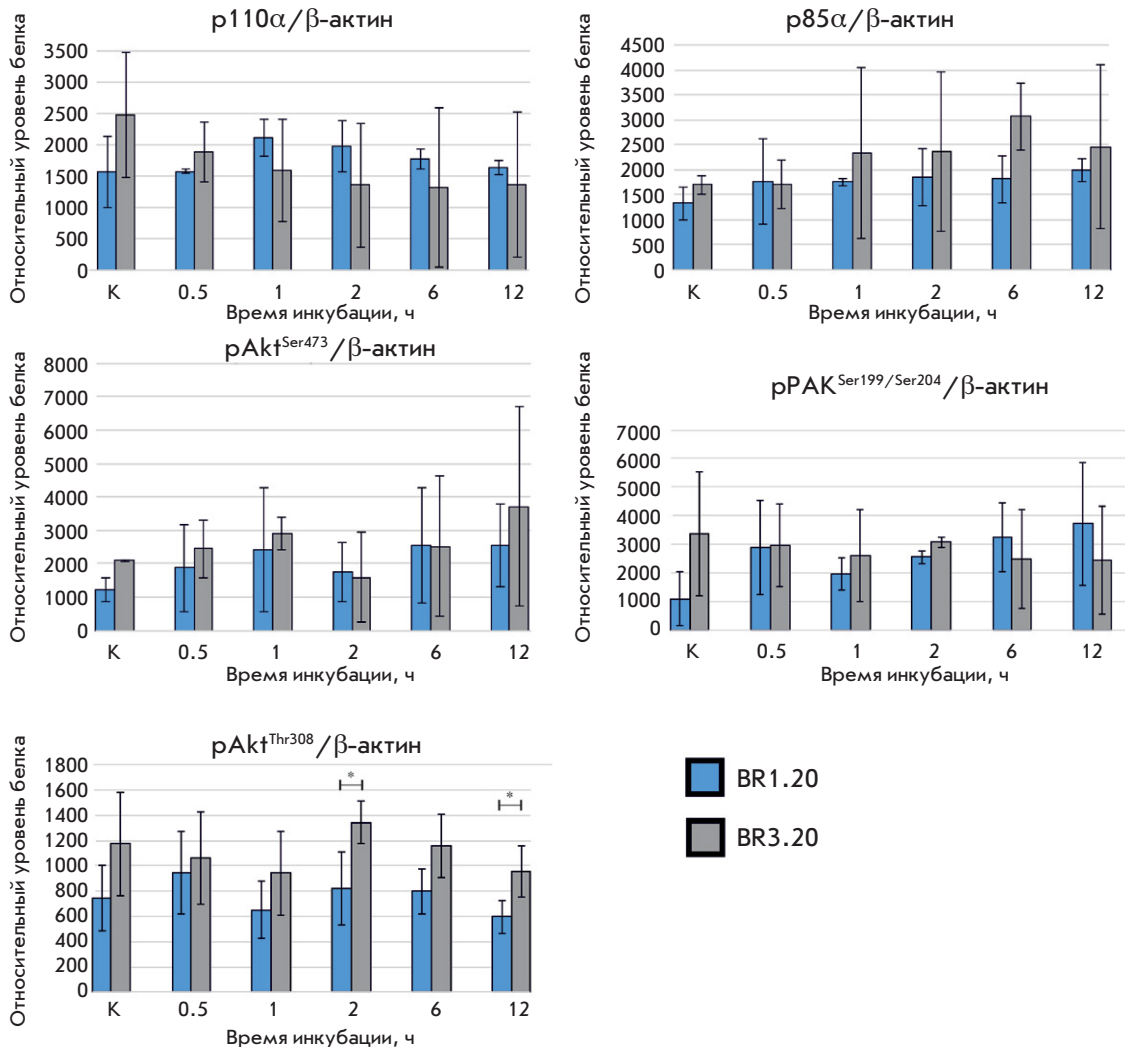


Рис. 6. Относительные уровни белков p85α и p110α, pAkt^{Ser473}, pAkt^{Thr308} и pPAK1^{Ser199/204} в клетках персонализированных культур BR1.20 и BR3.20 до и после инкубации с VV-GMCSF-Lact. (*p < 0.05)

к 0.5 ч инкубации с вирусом, затем снижался к 1 ч и снова возрастал к 12 ч. В то же время в клетках BR3.20 уровень PAK1 снижался к 1 ч инкубации с VV-GMCSF-Lact, возрастал к 2 ч и снова снижался к 12 ч. Количество pAkt^{Ser473} в клетках обеих культур возрастало к 1 ч инкубации, снижалось к 2 ч и снова возрастало к 12 ч. Уровень pAkt^{Thr308} напротив снижался к 1 ч, повышался к 2 ч и снова снижался к 12 ч инкубации в клетках обеих культур (рис. 5, 6). Однако к 2 и 12 ч инкубации с VV-GMCSF-Lact уровень pAkt^{Thr308} был значительно выше в более устойчивых к действию вируса клетках BR3.20. Таким образом, определение уровня описанных белков показало, что уровни p85α и p110α (регуляторная и каталитическая субъединицы PI3K соответственно), pAkt^{Ser473} и pPAK1^{Ser199/204} изменяются со временем инкубации, не различаясь существенно в клетках BR1.20 и BR3.20. Однако важно отметить, что уровень pAkt^{Thr308} в клетках BR3.20, более устойчивых к действию вируса, был выше и достоверно отличался от уровня pAkt^{Thr308} в клетках BR1.20 к 2 и 12 ч инкубации с вирусом.

Таким образом, молекулярные механизмы, регулирующие активацию PI3K и PAK1 и последующее проникновение вируса в опухолевые клетки, могут значительно различаться в разных клеточных моделях глиобластомы: в клетках иммортализованных и персонализированных культур. В процессы, опосредующие эффективность проникновения вируса осповакцины в клетку, могут быть вовлечены и другие молекулярные события. Например, клетки глиобластомы часто содержат делеции или мутации в гене опухолевого супрессора PTEN, который в свою очередь ингибирует активацию Akt [40, 41]. Также показано, что в клетках глиобластомы на высоком уровне экспрессируется PDK1, которая может активировать PAK1 и вовлечена в процессы реорганизации цитоскелета [42–44].

При этом эффективность проникновения VV-GMCSF-Lact в клетки глиобластомы не означает, что вирус проявляет выраженное онкотоксическое действие, поскольку для достижения цитотоксического эффекта вирус должен успешно реплицироваться в клетке. VV-GMCSF-Lact содержит делеции в генах вирусной тимидинкиназы и ростового фактора, что не позволяет ему реплицироваться в здоровых, нормально делящихся клет-

ках. Однако опухолевые клетки также могут различаться уровнем ростовых факторов и других белков, необходимых для репликации вирусной ДНК и последующей сборки новых вирусных частиц, что будет определять противоопухолевую эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении разных опухолей.

На основании полученных данных мы можем заключить, что в клетках глиобластомы человека, устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, повышен уровень активированной киназы Akt, которая ингибирует митохондриальный путь апоптоза, что, вероятно, снижает эффективность цитотоксического действия рекомбинантного вируса, экспрессирующего трансген лактаптин – индуктор апоптоза по митохондриальному пути.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют предположить, что клетки глиобластомы человека, чувствительные к онколитическому вирусу VV-GMCSF-Lact, отличаются меньшей степенью нарушений в каскадах программируемой клеточной гибели.

Механизмы резистентности глиобластомы к стандартной терапии интенсивно изучаются. Однако на сегодняшний день вопрос о формировании устойчивости глиобластомы к онколитическим вирусам остается открытым [6, 7]. Механизмы действия вируса осповакцины, на основе которого создан рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact, достаточно хорошо изучены. Также изучены процессы, происходящие в клетке-хозяине при проникновении в нее патогена. Как известно, опухолевые клетки, в частности СОК, характеризуются нарушениями во многих сигнальных путях, в регуляции клеточного цикла и каскадах программируемой клеточной гибели. Детальное изучение механизмов, способных вносить вклад в эффективность терапии с помощью VV-GMCSF-Lact, позволит выявить возможные маркеры опухолей, чувствительных к вирусному препарату, а также вероятные мишени комбинированной с VV-GMCSF-Lact терапии. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90041, исследование частично поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100238-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tan A.C., Ashley D.M., López G.Y., Malinzak M., Friedman H.S., Khasraw M. // *CA Cancer J. Clin.* 2020. V. 70. № 4. P. 299–312.
2. Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A., Grazhdantseva A., Troitskaya O., Nushtaeva A., Tkachenko A., Kuligina

- E., Richter V., Koval O. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 45. P. 74171–74188.
3. Vasileva N., Ageenko A., Dmitrieva M., Nushtaeva A., Mishinov S., Kochneva G., Richter V., Kuligina E. // *Life.* 2021. V. 11. № 10. P. 1084.
4. Mao P., Joshi K., Li J., Kim S.-H., Li P., Santana-Santos L.,

- Luthra S., Chandran U.R., Benos P.V., Smith L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 21. P. 8644–8649.
5. Bhat K.P.L., Balasubramanian V., Vaillant B., Ezhilarasan R., Hummelink K., Hollingsworth F., Wani K., Heathcock L., James J.D., Goodman L.D., et al. // *Cancer Cell*. 2013. V. 24. № 3. P. 331–346.
6. Zhang Q., Liu F. // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 6. P. 485.
7. Raja J., Ludwig J.M., Gettinger S.N., Schalper K.A., Kim H.S. // *J. Immunother. Canc.* 2018. V. 6. № 1. P. 140.
8. Moss B. // *Virology*. 2006. V. 344. № 1. P. 48–54.
9. Sobhy H. // *Arch. Virol.* 2017. V. 162. № 12. P. 3567–3585.
10. Mercer J., Helenius A. // *Science*. 2008. V. 320. № 5875. P. 531–535.
11. Mercer J., Helenius A. // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. № 5. P. 510–520.
12. Bahadur S., Sahu A.K., Baghel P., Saha S. // *Oncol. Rev.* 2019. V. 13. № 2. P. 114–124.
13. Skaga E., Kuleskiy E., Brynjulvsen M., Sandberg C.J., Potdar S., Langmoen I.A., Laakso A., Gaál-Paavola E., Perola M., Wennerberg K., et al. // *Clin. Translat. Med.* 2019. V. 8. № 1. P. 33.
14. Prager B.C., Bhargava S., Mahadev V., Hubert C.G., Rich J.N. // *Trends Cancer*. 2020. V. 6. № 3. P. 223–235.
15. Wang J., Wakeman T.P., Lathia J.D., Hjelmeland A.B., Wang X.-F., White R.R., Rich J.N., Sullenger B.A. // *Stem Cells*. 2009. V. 28. № 1. P. 17–28.
16. Hassn Mesrati M., Behrooz A.B., Abuhamad Y.A., Syahir A. // *Cells*. 2020. V. 9. № 5. P. 1236.
17. Lauko A., Lo A., Ahluwalia M.S., Lathia J.D. // *Semin. Cancer Biol.* 2021. P. S1044579X21000493.
18. Capela A., Temple S. // *Neuron*. 2002. V. 35. № 5. P. 865–875.
19. Son M.J., Woolard K., Nam D.-H., Lee J., Fine H.A. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 5. P. 440–452.
20. Moos M., Tacke R., Scherer H., Teplow D., Früh K., Schachner M. // *Nature*. 1988. V. 334. № 6184. P. 701–703.
21. Mohanan V., Temburni M.K., Kappes J.C., Galileo D.S. // *Clin. Exp. Metastasis*. 2013. V. 30. № 4. P. 507–520.
22. Cheng L., Wu Q., Huang Z., Guryanova O.A., Huang Q., Shou W., Rich J.N., Bao S. // *EMBO J*. 2011. V. 30. № 5. P. 800–813.
23. Held-Feindt J., Schmelz S., Hattermann K., Mentlein R., Mehdorn H.M., Sebens S. // *Neurochem. Internat.* 2012. V. 61. № 7. P. 1183–1191.
24. Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 15. P. 6043–6048.
25. Li Z. // *Exp. Hematol. Oncol.* 2013. V. 2. № 1. P. 17.
26. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N. // *Nature*. 2006. V. 444. № 7120. P. 756–760.
27. Wei Y., Jiang Y., Zou F., Liu Y., Wang S., Xu N., Xu W., Cui C., Xing Y., Liu Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 17. P. 6829–6834.
28. Soares J.A.P., Leite F.G.G., Andrade L.G., Torres A.A., De Sousa L.P., Barcelos L.S., Teixeira M.M., Ferreira P.C.P., Kroon E.G., Souto-Padrón T., et al. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 13. P. 6883–6899.
29. Diehl N., Schaal H. // *Viruses*. 2013. V. 5. № 12. P. 3192–3212.
30. El-Jesr M., Teir M., Maluquer de Motes C. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 568412.
31. Lei M., Lu W., Meng W., Parrini M.-C., Eck M.J., Mayer B.J., Harrison S.C. // *Cell*. 2000. V. 102. № 3. P. 387–397.
32. Meshki J., Douglas S.D., Hu M., Leeman S.E., Tuluc F. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 9. P. e25332.
33. Moore S.F., Hunter R.W., Hers I. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 28. P. 24553–24560.
34. Meade N., Furey C., Li H., Verma R., Chai Q., Rollins M.G., DiGiuseppe S., Naghavi M.H., Walsh D. // *Cell*. 2018. V. 174. № 5. P. 1143–1157.e17.
35. Alessi D.R., James S.R., Downes C.P., Holmes A.B., Gaffney P.R.J., Reese C.B., Cohen P. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. № 4. P. 261–269.
36. Manning B.D., Cantley L.C. // *Cell*. 2007. V. 129. № 7. P. 1261–1274.
37. Memmott R.M., Dennis P.A. // *Cell. Signal.* 2009. V. 21. № 5. P. 656–664.
38. Zhou H., Li X.-M., Meinkoth J., Pittman R.N. // *J. Cell Biol.* 2000. V. 151. № 3. P. 483–494.
39. Фомин А.С., Коваль О.А., Семенов Д.В., Потапенко М.О., Кулигина Е.В., Кит Ю.Я., Рихтер В.А. // *Биоорганическая химия*. 2012. Т. 38. № 1. С. 1–7.
40. Cetintas V.B., Batada N.N. // *J. Transl. Med.* 2020. V. 18. № 1. P. 45.
41. Smith J.S., Tachibana I., Passe S.M., Huntley B.K., Borell T.J., Iturria N., O’Fallon J.R., Schaefer P.L., Scheithauer B.W., James C.D., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2001. V. 93. № 16. P. 1246–1256.
42. Geue S., Aurbach K., Manke M.-C., Manukjan G., Münzer P., Stegner D., Brähler C., Walker-Allgaier B., Märklin M., Borst C.E., et al. // *Blood*. 2019. V. 134. № 21. P. 1847–1858.
43. Han J.E., Lim P.W., Na C.M., Choi Y.S., Lee J.Y., Kim Y., Park H.W., Moon H.E., Heo M.S., Park H.R., et al. // *Exp. Neurobiol.* 2017. V. 26. № 5. P. 295–306.
44. Velpula K.K., Tsung A.J. // *CNS Oncology*. 2014. V. 3. № 3. P. 177–179.