

На правах рукописи

ЧЕРНОРЫЖ

Яна Юрьевна

**УСТОЙЧИВОСТЬ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК,
ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА,
К ДЕЙСТВИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА
ДОКСОРУБИЦИНА**

03.02.02 - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

Научный руководитель: **Куш Алла Александровна**
доктор биологических наук, профессор, руководитель отдела молекулярной вирусологии, заведующая лабораторией клеточной инженерии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Официальные оппоненты: **Нагиева Фиряя Галиевна**
доктор медицинских наук, заведующая лабораторией гибридных клеточных культур федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Куханова Марина Константиновна
доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории биохимии вирусных инфекций федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммуно-биологических препаратов им. М.П. Чумакова» Российской академии наук

Защита состоится «**18**» мая **2020 г. в 12-00 часов** на заседании диссертационного совета Д 208.130.03 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра www.gamaleya.org.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Бурцева Елена Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Цитомегаловирус (ЦМВ) широко распространен в человеческой популяции, о чем свидетельствуют данные об обнаружении антител к ЦМВ у 40%-95% жителей в разных регионах мира [Griffiths P. et al., 2013]. ЦМВ инфекция (ЦМВИ) у иммунокомпетентных лиц редко вызывает клинически выраженные заболевания, тогда как у лиц с иммуносупрессией различной этиологии заражение ЦМВ может привести к поражениям различных органов и систем, стать причиной тяжелых заболеваний с неблагоприятным исходом [Manicklal S. et al., 2013]. Особенностью ЦМВИ является переход литической инфекции в латентную форму, которая позволяет вирусу пожизненно присутствовать в организме и реактивироваться под действием многочисленных внутренних и внешних факторов [Sinclair J. et al., 2013]. Реактивация ЦМВ особенно опасна для беременных женщин и новорожденных детей, а также для ВИЧ-инфицированных пациентов и лиц после трансплантации органов и тканей.

В течение последних лет опубликованы данные об обнаружении вирусных генов в значительном количестве опухолей человека разного происхождения, в связи с чем возникает вопрос о роли вирусов в установлении резистентности к противоопухолевым антибиотикам. Одним из часто обнаруживаемых вирусов в опухолевых клетках является ЦМВ [Jin J. et al., 2014; Cobbs C.S. et al., 2014; C. Soderberg-Naucler et al., 2015]. Недавно показана возможность реактивации латентного ЦМВ в клетках злокачественной гематологической опухоли – ТНР-1 [Arcangeletti M.C. et al., 2016]. Клетки моноцитарной лейкемии ТНР-1 представляют удобную модель для изучения клеточных и молекулярных механизмов взаимодействия вирусных и клеточных факторов, приводящих к возникновению устойчивости к антибиотикам, среди которых широко применяется противоопухолевый препарат доксорубин (ДОКС). Причины возникновения резистентности активно изучаются многими исследователями [Nikolaou M. et al., 2018], однако молекулярные и клеточные механизмы во многих случаях остаются не раскрытыми.

Одним из возможных объяснений неэффективного действия ДОКС может быть антиапоптозная программа, которую запускает ЦМВ в зараженной клетке [Perrenelli M.A. et al., 2016], что способствует выживанию опухолевых клеток, обработанных антибиотиком. Чувствительность к цитостатикам связана с активностью генов опухолевых супрессоров p53, в том числе, менее изученного белка этого семейства p73. Изоформы белка p73 могут оказывать как проонкогенное, так и антионкогенное действие [Stiewe T. et al., 2002]. Влияние ЦМВИ на изоформы p73 в опухолевых клетках ТНР-1 и действие ДОКС на экспрессию p73 в инфицированных клетках мало изучены. В то же время показано, что при ЦМВИ активируются молекулярные пути, включающие

экспрессию транскрипционного фактора E2F1. Представляло интерес выяснить влияние E2F1 на изоформы белка p73 и установить связь активности E2F1 с изменением чувствительности к ДОКС инфицированных ЦМВ клеток ТНР-1. Активность транскрипционных факторов E2F1 и p73 зависит от уровня метаболических процессов в клетках, в том числе от уровня биогенных полиаминов. Биогенные полиамины участвуют в пролиферации и программированной гибели клеток, однако влияние ЦМВИ на цикл полиаминов в злокачественных гематологических опухолях и устойчивость к антибиотикам пока недостаточно изучены.

Недавние исследования продемонстрировали участие сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в регуляции ЦМВИ и показали, что ЦМВ модулирует молекулярный путь PI3K/Akt/mTOR в латентно инфицированных моноцитах [Nehme Z. et al., 2019].

Цель исследования – изучить влияние ЦМВ на устойчивость опухолевых клеток к препарату ДОКС, оценить роль транскрипционных факторов E2F1 и изоформ белка p73 в формировании резистентности к антибиотикам, а также определить вклад молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR и биогенных полиаминов в поддержании устойчивости к ДОКС.

Задачи исследования:

1. Провести количественный анализ маркеров ЦМВ (вирусные ДНК, мРНК и белков ЦМВ) в клетках ТНР-1 в динамике ЦМВИ.
2. Оценить влияние ДОКС на жизнеспособность ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1 в разные сроки после заражения.
3. Изучить влияние ДОКС на повреждение ДНК и активацию каспаз 3, 8 и 9 в инфицированных и неинфицированных клетках ТНР-1.
4. Определить содержание изоформ белка p73 и транскрипционного фактора E2F1 в ЦМВ инфицированных и неинфицированных клетках ТНР-1 под действием ДОКС.
5. Оценить влияние ингибиторов метаболизма полиаминов: DFMO и MDL72.527 на жизнеспособность клеток, обработанных ДОКС в разные сроки ЦМВИ. Провести сравнительный анализ соотношения изоформ белка p73 и транскрипционного фактора E2F1 в клетках ТНР-1 в присутствии ингибиторов цикла полиаминов.
6. Изучить действие ингибиторов молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR на чувствительность клеток ТНР-1 к действию ДОКС инфицированных ЦМВ клеток при активной и латентной ЦМВИ.
7. Оценить возможность сочетанного использования ДОКС и ингибиторов клеточного метаболизма для восстановления чувствительности клеток ТНР-1 к антибиотикам.

Научная новизна

1. Впервые показано, что гемопозитические опухолевые клетки ТНР-1 устойчивы к противоопухолевому препарату ДОКС как при активной

ЦМВИ при первичном заражении, так и при воздействии ДОКС на латентно инфицированные клетки лейкемии.

2. Установлено, что формирование устойчивости к ДОКС в клетках ТНР-1 ассоциируется с изменением соотношения изоформ белка p73 – увеличением содержания укороченной проонкогенной формы DNp73, а также со значительным увеличением содержания транскрипционного фактора E2F1.

3. Впервые показано участие внутриклеточных метаболических процессов цикла биогенных полиаминов и молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR в формировании резистентности к ДОКС клеток, инфицированных ЦМВ, в том числе в латентной фазе. Установлено, что подавление катаболизма полиаминов и ферментов пути mTOR восстанавливают чувствительность к ДОКС клеток моноцитарной лейкемии ТНР-1, инфицированных ЦМВ.

4. Установлено, что молекулярный механизм восстановления чувствительности к ДОКС под действием MDL72.527 включает активацию регуляторного пути E2F1/p73, что приводит к запуску апоптозной программы в инфицированных опухолевых клетках.

5. Впервые показано, что сочетанное применение ДОКС с ингибиторами метаболизма полиаминов и пути mTOR позволяет уменьшить концентрации использованных соединений в 2-4 раза при сохранении эффективности восстановления чувствительности клеток ТНР-1 к антибиотику.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности диагностики ЦМВИ у пациентов с гематологическими опухолями, у которых терапия противоопухолевыми препаратами оказывается неэффективной. Определение соотношения изоформ белка p73 и выявление сдвига в сторону DNp73 в опухолевых клетках, содержащих ЦМВ, позволит прогнозировать развитие болезни и будет способствовать выбору оптимальных терапевтических стратегий для людей со злокачественными заболеваниями системы крови, а также оптимизировать индивидуальный подход при лечении опухолей.

Полученные данные свидетельствуют о том, что метаболический путь полиаминов и молекулярный путь PI3K/Akt/mTOR являются перспективной мишенью для дальнейших исследований с целью разработки агентов, способных преодолеть резистентность опухолей, инфицированных ЦМВ, к лечебным препаратам. Комбинированное применение ДОКС и ингибитора катаболизма полиаминов MDL72.527, а также сочетанное использование ДОКС с ингибиторами PI3K и mTOR, представляют новую стратегию для лечения лейкемии у ЦМВ инфицированных и неинфицированных пациентов.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования послужили современные подходы к анализу теоретических проблем вирусологии и применение комплекса экспериментальных методов вирусологии. В работе использованы также актуальные методы молекулярной биологии, а также методы прикладной статистики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В клетках ТНР-1 активная ЦМВИ переходит в латентную фазу в течение 14 дней после заражения.

2. Клетки ТНР-1, инфицированные ЦМВ, устойчивы к действию ДОКС как при активной (24 ч после заражения), так и при латентной (7-14 сут) инфекции.

3. В активно инфицированных ЦМВ клетках ТНР-1 в 1,6 раз снижается количество разрывов ДНК под действием ДОКС, а также в 3,8 раза уменьшается количество клеток, содержащих маркеры апоптоза - активированные формы каспаз 3, 8 и 9, по сравнению с неинфицированными опухолевыми клетками.

4. В ЦМВ инфицированных клетках, обработанных ДОКС, отношение полноразмерной изоформы белка p73 TAp73 к укороченной изоформе DNp73 уменьшается в 1,8 раз по сравнению с неинфицированными ТНР-1, что ассоциируется с 6-кратным повышением содержания транскрипционного фактора E2F1.

5. Ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527 восстанавливает чувствительность ТНР-1 к ДОКС как при активной, так и при латентной ЦМВ инфекции. Восстановление чувствительности сопровождается увеличением соотношения TAp73/DNp73 и повышением уровня E2F1 в присутствии MDL72.527 в 9 раз по сравнению с уровнем контрольных клеток, обработанных ингибитором.

6. Преодоление резистентности к ДОКС ингибиторами молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR показано при воздействии как на активно инфицированные ЦМВ клетки ТНР-1, так и на латентно инфицированные опухолевые клетки.

7. Комбинированное применение ДОКС и ингибиторов метаболизма опухолевой клетки (цикла полиаминов и ферментов пути mTOR) позволяет уменьшить цитотоксические концентрации соединений и полностью восстановить чувствительность клеток лейкемии к ДОКС.

Декларация личного участия автора.

Все этапы работы выполнены автором лично. Самостоятельно проведен анализ и интерпретация полученных результатов; лично или при непосредственном участии автора подготовлены публикации по материалам исследования. Суммарное личное участие автора в работе составляет не менее 95%.

Внедрение результатов исследования.

Полученные результаты диссертационной работы используются: кафедрой онкологии с усовершенствованием врачей ФГБОУ ВО ДГМУ Минздрава России при обучении студентов 5-6 курсов, интернов, клинических ординаторов и аспирантов; отделением гематологии ГБУ РД «Республиканской клинической больницы» для дополнительной диагностики цитомегаловирусной инфекции у пациентов с моноцитарной лейкемией резистентной к химиотерапии доксорубицином и применение рапамицина в комплексе терапии у пациентов с выявленной цитомегаловирусной инфекцией.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов обусловлена использованием достаточного объема фактического материала, применением адекватных поставленным задачам методов исследования и использованием современных методов статистической обработки экспериментальных данных.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих научных мероприятиях: XXIV международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов - 2017», 10-14 апреля, 2017, Москва; международная научная конференция «Клиническая протеомика. Постгеномная медицина» 30 октября - 1 ноября 2017, Москва; IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, 17-19 декабря 2018, Москва; XX международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке», 17-20 декабря 2018; международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» 18-22 июня 2019, Санкт-Петербург; VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» 16-20 сентября 2019, Севастополь; Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий», 8-11 октября 2019, Санкт-Петербург.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 12 работ: 6 статей, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК, а также 6 тезисов докладов в сборниках материалов российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 51 рисунок. Диссертационная работа включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждение, а также заключение, выводы, список сокращений и список литературы, состоящий из 26 отечественных и 282 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Использовали перевиваемые клетки лейкемии человека ТНР-1 и фибробласты легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ), полученные из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ.

Вирус. Цитомегаловирус человека (ЦМВ) штамм AD 169 получен из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Вирус пассировали в клетках ФЛЭЧ.

Определение инфекционной активности вируса проводили модифицированным методом «черных» бляшек, используя возрастающие десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости (ВСЖ). Очаги инфицированных клеток (бляшек) выявляли иммуноцитохимическим методом с использованием смеси моноклональных антител (МКА) к белкам IE1-p72 и pp65 ЦМВ. Титр вируса выражали в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ), содержащихся в 1 мл ВСЖ.

Инфицирование ЦМВ клеток ТНР-1. Клетки ТНР-1 осаждали центрифугированием 10 мин при 400 g. На осадок клеток наносили ВСЖ (5 БОЕ/кл), ресуспензировали и инкубировали 1 час при 37°C. Затем клетки центрифугировали (400 g, 10 мин.), отбирали супернатант и ресуспензировали в поддерживающей среде: RPMI 1640 с 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС).

Обработка ДОКС. Клетки ТНР-1 заражали ЦМВ (5 БОЕ/кл.). Через 4 ч, 7 и 14 суток после инфицирования (с.п.и.) в клетки вносили 5 мкг/мл ДОКС и инкубировали 24 ч. Действие ДОКС изучали с помощью методов, описанных ниже. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз.

Иммунофлуоресцентный анализ белков ЦМВ. Инфицированные клетки ТНР-1 отбирали через 4 ч, 1, 2, 3, 7 и 14 с.п.и., дважды промывали ФСБ (0,1 М, рН 7,4), наносили на предметные стекла, фиксировали ацетоном (-20°C, 10 мин) и проводили иммунофлуоресцентную окраску (ИФЛ). В качестве первичных антител использовали мышинные МКА, специфичные к вирусным белкам IE1-p72, pp65 и gB. В качестве вторых антител - козы антимышинные антитела, конъюгированные с флюорохромом Су-3. Ядра клеток докрашивали DAPI. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX-51 (Япония). Проводили подсчет окрашенных и неокрашенных клеток. Долю клеток, содержащих вирусные белки, выражали в процентах от общего количества клеток.

Выявление белков методом иммуноблота. Опытные и контрольные клетки ТНР-1 отбирали и промывали ФСБ (0,1 М, рН 7,4), центрифугируя при 17000 g, 10 мин. Осадок клеток лизировали буфером RIPA Lysis Buffer Kit. Электрофорез (ЭФ) белков проводили в 12% полиакриламидном геле с применением буферной системы для SDS-электрофореза по Лэммли.

После ЭФ белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0.45 мкм и инкубировали 12 ч при 4°C в блок-растворе (5% сухого молока, 0.1% Tween-20 в ФСБ), затем помещали в блок-раствор с МКА к белкам ЦМВ (IE1-p72, pp65 и gB) или к клеточным белкам (p73, E2F1 и β -актин). В качестве вторичных антител использовали кроличьи анти-мышинные иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена. Для выявления комплекса антиген-антитело использовали субстрат Clarity™WesternECL. Для детекции сигнала хемилюминесценции использовали рентгеновскую фотопленку (Carestream, США).

Анализ мРНК вирусных и клеточных генов методом ОТ-ПЦР.

Тотальную РНК выделяли из клеток с использованием реагента Тризол (Invitrogen). кДНК получали с использованием обратной транскриптазы MultiScribe. Для проведения ОТ-ПЦР применяли LightCycler® 480 System (Roche).

Гибридизация in situ. Клетки ТНР-1 через 24 ч, 5 и 7 с.п.и. дважды промывали в ФСБ, наносили на предметные стекла, фиксировали метанолом 30 мин., высушивали. Препараты клеток обрабатывали 3% раствором перекиси водорода 15 мин, протеиназой К (Dako) (1,5 мин.), глицином на ФСБ (2 мг/мл, 5 мин.), проводили дегидратацию спиртовыми растворами, высушивали 5-10 мин при 37°C. Затем наносили гибридизационный буфер с биотинилированной ДНК ЦМВ (EnzoLifeSciences). и постгибридизационный реагент. Для детекции гибридизационной метки использовали Ultra Sensitive Enhanced Hrp-DAB in situ detection system (Enzo). Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Olympus (ок.10x, об. x100), (Япония).

Определение инфекционно активного ЦМВ в клетках ТНР-1

проводили в различные сроки после заражения. Отбирали культуральную жидкость от зараженных ТНР-1 и вносили в чувствительные клетки ФЛЭЧ. Инфекционную активность вируса определяли методом «черных» бляшек.

Цитотоксическое действие ДОКС на инфицированные и неинфицированные клетки ТНР-1 определяли по влиянию на жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего и МТТ. После окрашивания 0,4% раствором трипанового синего в течение 5 мин количество нежизнеспособных (окрашенных) и жизнеспособных (неокрашенных) клеток подсчитывали в камере Горяева. Методом линейной регрессии с использованием пакета документов MicrosoftExcel рассчитывали концентрацию ДОКС, при которой погибает 50% клеток ($ЦД_{50}$).

МТТ-тест. Для определения цитотоксичности соединений в лунки добавляли 20 мкл МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (5 мг/мл) на 2 ч. Для растворения образовавшихся кристаллов формазана использовали закисленный изопропанол (0,04N HCl). С помощью планшетного анализатора Antos 2010 (Austria) определяли

оптическую плотность при 530 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающей гибель 50% клеток (CD_{50}), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.

Цитотоксическое действие ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1. Через 4 ч, 7 и 14 с.п.и. в инфицированные и неинфицированные клетки вносили 5 мкг/мл ДОКС и инкубировали в течение 24 ч. После инкубации в опытных и контрольных культурах количество нежизнеспособных клеток определяли с помощью трипанового синего и МТТ как описано выше.

Выявление фрагментированной клеточной ДНК in situ. Клетки наносили на предметные стекла и фиксировали в 3% параформальдегиде. Затем обрабатывали 20 мин 0,1% Тритон X-100. Для обнаружения нуклеосомных разрывов ДНК использовали набор DeadEndTM Fluorometric TUNEL System. Препараты анализировали в флюоресцентном микроскопе (Zeiss, Германия). Долю положительно окрашенных клеток, содержащих разрывы ДНК, выражали в процентах от общего количества клеток.

Выявление маркеров апоптоза проводили в реакции непрямой ИФЛ с использованием антител к каспазам 3, 8 и 9 и выявляющих антител, конъюгированных с флюорохромом Cy-3. Ядра клеток окрашивали DAPI. Препараты изучали в флюоресцентном микроскопе Zeiss, Германия. Долю окрашенных клеток, содержащих активированные каспазы, выражали в процентах от общего количества клеток.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 (StatSoftInc., США). Для сравнения параметрических количественных данных использовали t-test (критерий Стьюдента). Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ЦМВ на морфологию и рост клеток ТНР-1. Морфологически неинфицированные и инфицированные клетки ТНР-1 через 1 с.п.и. не различались, но начиная со 2-х с.п.и., изменялись межклеточные контакты – исчезали скопления (грозди) клеток, в клетках появлялись цитоплазматические вакуоли и значительно уменьшались размеры клеток. Количество клеток в зараженной культуре через 1 сут снижалось на $32 \pm 1,9\%$ ($p < 0,05$), и затем практически не увеличивалось. Клетки росли медленно, и к 14 с.п.и. концентрация зараженных клеток незначительно превосходила исходную (до заражения).

Изменение доли клеток ТНР-1, содержащих белки ЦМВ, в динамике ЦМВИ. Белки ЦМВ выявляли методом ИФЛ с использованием МКА, направленных к сверхраннему IE1-p72, раннему pp65 и позднему gB белкам ЦМВ. Подсчет положительно окрашенных клеток показал (таблица

1), что количество клеток, содержащих сверхранный IE1-p72 и ранний pp65 белки ЦМВ через 4 ч.п.и., составляло около 4%, затем снижалось и на 7 с.п.и. не обнаруживалось. Клетки, окрашенные МКА к позднему белку gB, определялись, начиная со 2 с.п.и., их количество увеличилось к 3 с.п.и. ($p < 0.05$), но к 14 с.п.и. клетки, содержащие gB, обнаружены не были.

Таблица 1. Сравнительный анализ количества клеток ТНР-1, содержащих вирусные белки, в динамике ЦМВИ

Вирусные белки	Время после инфицирования					
	4 ч	1 сут	2 сут	3 сут	7 сут	14 сут
IE1-p72	4.5±0.4*	4.2±0.7	2.3±0.5	1.4±0.3	0	0
pp65	3.6±0.5	3.0±0.2	1.7±0.2	1.0±0.2	0	0
gB	0	0	1.5±0.3	3.4±0.2	0.1±0.03	0

* Количество клеток, содержащих вирусные белки, %

Выявление белков ЦМВ методом иммуноблота. Содержание вирусных белков в клетках ТНР-1 определяли в клеточных лизатах методом иммуноблота (рисунок 1).

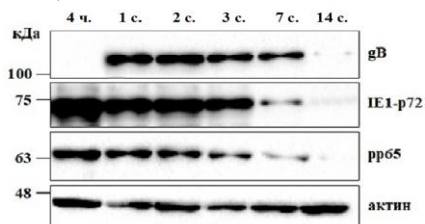


Рис. 1. Сравнительный анализ содержания вирусных белков в ЦМВ-инфицированных клетках ТНР-1 методом иммуноблота в различные сроки после заражения.

Полученные данные показали, что динамика выявления белков IE1-p72 и pp65 методом иммуноблота и ИФЛ в принципе совпадает, данные по позднему гликопротеину gB - различаются. Методом иммуноблота белок gB был выявлен в первые сутки инфекции, тогда как в реакции ИФЛ в этот период не было выявлено клеток, содержащих вирусный белок (таблица 1). Отличия в детекции вирусных белков можно объяснить различным клеточным материалом (лизаты или неразрушенные клетки), а также различной чувствительностью методов. Можно констатировать, что после проникновения ЦМВ в клетки ТНР-1 начинается каскадный синтез вирусных белков как регуляторных (IE1-p72), так и структурных (pp65 и gB), но через 14 с.п.и. все изученные белки ЦМВ не выявляются при использовании обоих методов.

Определение ДНК ЦМВ в клетках ТНР-1. Отсутствие вирусных белков на поздних стадиях ЦМВ-инфекции в клетках ТНР-1 может свидетельствовать о том, что ЦМВ либо элиминирует, либо сохраняется в клетках, но переходит в неактивное состояние. В связи с этим были проведены опыты, направленные на обнаружение вирусной ДНК в культуре ТНР-1 на протяжении 14 с.п.и. ДНК ЦМВ выявляли двумя методами - методом ПЦР в лизатах клеток и методом ДНК-ДНК гибридизации в клетках *in situ*. Методом гибридизации ДНК ЦМВ *in situ* было установлено, что через 1 с.п.и. $84 \pm 5\%$ клеток содержали ДНК ЦМВ (рисунок 2А). Результаты, полученные методом ПЦР в реальном времени, показали (рисунок 2Б), что к 14 с.п.и. относительное содержание вирусной ДНК практически не изменялось в динамике инфекции. При пересчете на клетку концентрация ДНК ЦМВ через 1 с.п.и. составляла $15 \pm 6,4$ копий/кл и через 14 с.п.и. - $18 \pm 5,6$ копий/кл ($p > 0,05$).

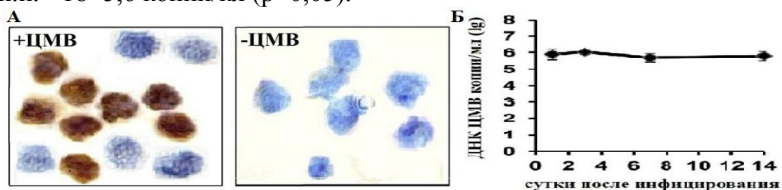


Рис. 2. А. Обнаружение ДНК ЦМВ в клетках ТНР-1 через 1 с.п.и. методом ДНК-ДНК гибридизации *in situ*. Увеличение 400х. Коричневая окраска – метка ДНК ЦМВ, синяя окраска - гематоксилин. **Б.** Количественная оценка уровней вирусной ДНК в динамике ЦМВИ в клетках ТНР-1 по данным ПЦР в реальном времени.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после инфицирования ЦМВ вирусная ДНК длительно присутствует в клетках ТНР-1, тогда как содержание вирусных белков постепенно снижается и к 14 суткам не обнаруживается.

Транскрипционную активность вирусных генов оценивали по экспрессии пяти генов, три из которых активны при литической ЦМВИ: *UL122*, кодирующий белок IE2-p86; *UL54*, кодирующий вирусную ДНК-полимеразу; *UL83*, кодирующий белок текумента pp65. Определяли также мРНК двух генов, активность которых описана при латентной ЦМВИ: *UL138* и *UL82*. В качестве референсного гена использовали *GUS*, кодирующий бета-глюкуронидазу человека. Количественное определение мРНК проводили с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Показано, что к 7 с.п.и. уровни мРНК *UL138* и *UL82* увеличивались в 6 раз и 8 раз соответственно и поддерживались на высоком уровне до 14 с.п.и. Уровни мРНК литических генов *UL54*, *UL83* и *UL122* к 14 с.п.и. резко снижались.

Количественный анализ мРНК 5 изученных генов ЦМВ показал, что изменения уровней транскрипции генов *UL138* и *UL82*, с одной стороны, и генов *UL122*, *UL54* и *UL83* – с другой, имели противоположную

направленность в динамике ЦМВИ в клетках ТНР-1: экспрессия латентных генов возрастала, тогда как литических – снижалась.

Отсутствие инфекционно активного вируса в клетках ТНР-1, зараженных ЦМВ. В лунки с клетками ФЛЭЧ вносили культуральную жидкость от ЦМВ-инфицированных ТНР-1, взятую на разных сроках после заражения. Наблюдения показали, что ни на одном из сроков (5, 7 и 14 с.п.и.) в лунках не были выявлены зараженные клетки ФЛЭЧ, которые детектировали с помощью смеси МКА к белкам IE1-p72 и pp65 ЦМВ. В то же время в культуре ФЛЭЧ к 7 с.п.и. (положительный контроль) количество инфицированных клеток составляло около 100%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в клетках ТНР-1 не происходило образования инфекционно активного вируса. Эти данные подтверждают вывод о том, что инфекция ЦМВ в клетках моноцитарной лейкемии носит abortивный характер и к 14 с.п.и. переходит в латентное состояние.

Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1, инфицированные ЦМВ. Влияние ДОКС на жизнеспособность неинфицированных клеток ТНР-1 оценивали, используя концентрации ДОКС от 0,5 до 10 мкг/мл. IC_{50} составила 2,5 мкг/мл, однако в дальнейших опытах мы использовали концентрацию ДОКС равную 5 мкг/мл, при которой наблюдалось снижение жизнеспособности клеток ТНР-1 на 80%. Такая концентрация была выбрана на основании многочисленных опытов с целью более четкого определения различий в действии ДОКС на неинфицированные и ЦМВ инфицированные клетки. Для изучения действия ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 антибиотик в концентрации 5 мкг/мл вносили через 4 ч, 7 и 14 с.п.и. на 24 ч.

Внесение ДОКС в инфицированную культуру через 4 ч после заражения и последующая инкубация в течение 24 ч (срок обозначили как 1 сутки) не привели к изменению количества нежизнеспособных клеток по сравнению с инфицированной культурой, не обработанной ДОКС: $32 \pm 1,9\%$ и $34 \pm 1,1\%$, соответственно ($p > 0,05$). В культурах ТНР-1, обработанных ДОКС на 7 с.п.и. доля нежизнеспособных клеток составляла $24 \pm 2,2\%$, на 14 с.п.и. – $7 \pm 1,6\%$, тогда как в неинфицированных клетках – $82 \pm 1,7\%$ и $79 \pm 4,6\%$, соответственно (рисунок 3).

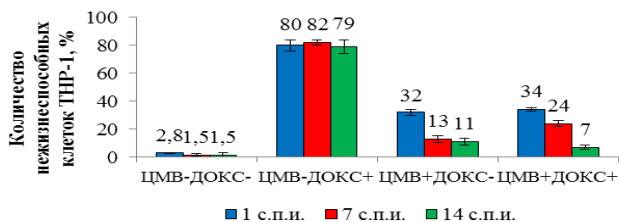


Рис. 3. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1 в разные сроки после заражения.

Полученные результаты показали, что после заражения ЦМВ клетки ТНР-1 приобретают устойчивость к действию ДОКС, причем резистентность к ДОКС проявлялась как на ранних сроках инфекции - 4 ч, так и на поздних – 7 и 14 с.п.и.

Для изучения молекулярных механизмов устойчивости инфицированных клеток ТНР-1 к ДОКС использовали ряд ингибиторов.

Изменение цитотоксического действия ДОКС на клетки ТНР-1, инфицированные ЦМВ, в присутствии ингибиторов метаболизма полиаминов MDL72.527 и DFMO. Через 4 ч после заражения ЦМВ вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с MDL72.527 в концентрации 20 мкМ/мл, либо с DFMO в концентрации 9 мкМ/мл и инкубировали 24 ч. В присутствии MDL72.527 количество нежизнеспособных инфицированных клеток под действием ДОКС увеличилось с $34 \pm 1,1\%$ до $92,3 \pm 4,2\%$ ($p < 0,05$), в присутствии DFMO количество нежизнеспособных клеток ТНР-1 статистически значимо не изменилось (рисунок 4).

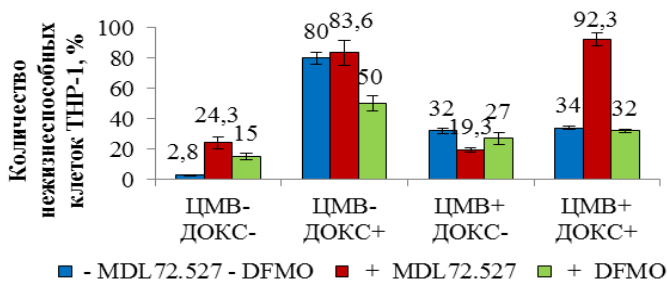


Рис. 4. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1 через 1 с.п.и. ЦМВ в присутствии ингибиторов метаболизма полиаминов MDL72.527 и DFMO.

Эти данные указывают на то, что MDL72.527, ингибитор ферментов катаболизма полиаминов, восстанавливал чувствительность клеток ТНР-1 к ДОКС уже в первые сутки ЦМВИ. Напротив, DFMO, ингибитор орнитиндекарбоксилазы (ODC), снижающий уровни внутриклеточных полиаминов, не оказывал статистически значимого влияния на жизнеспособность ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1, обработанных ДОКС.

Сходное действие оказывал MDL72.527 на клетки, инфицированные ЦМВ через 7 и 14 с.п.и.: при обработке ДОКС наблюдалась гибель практически всех клеток ТНР-1. Таким образом, восстановление чувствительности к ДОКС в присутствии ингибитора в латентно инфицированных ЦМВ клетках ТНР-1 происходило столь же или более эффективно, как и в активно инфицированных клетках: количество

погибших клеток через 1 с.п.и. увеличивалось в 2,7 раз, через 14 с.п.и. – в 13,7 раз.

Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1, инфицированные ЦМВ, в присутствии ингибиторов молекулярного пути mTOR.

Путь mTOR в качестве мишени для изучения резистентности клеток ТНР-1 к ДОКС выбран в связи с имеющимися данными о том, что его активность способствует выживанию клеток в неблагоприятных условиях.

Для выяснения влияния ингибиторов этого пути на действие ДОКС в культуру через 1, 7 и 14 с.п.и. ЦМВ вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с 8,5 мкг/мл рапамицина (РАПА), либо с 0,05 мкг/мл Торина2 (оба - ингибиторы mTOR), либо с 11 мкМ/мл LY294002 (ингибитор PI3K) и инкубировали 24 ч. Ингибиторы мало влияли на высокое цитотоксическое действие ДОКС на незараженные клетки ТНР-1, но значительно усиливали действие ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки (рисунок 5).

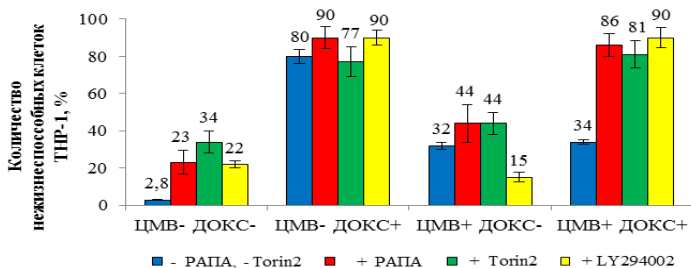


Рис. 5. Цитотоксическое действие ДОКС и ингибиторов пути mTOR на неинфицированные и ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 через 1 с.п.и.

Результаты, полученные при воздействии ингибиторов mTOR на 7 и 14 с.п.и. ЦМВ, принципиально не отличались от тех, которые были получены через 1 сут. Совместное действие ДОКС и ингибиторов mTOR на ЦМВ инфицированные клетки приводило к гибели 90±6% (РАПА) и 72±2,4% (Торин2) на 7 с.п.и. по сравнению с 24% без ингибиторов. На 14 с.п.и. также наблюдалось значительное снижение жизнеспособности ЦМВ инфицированных клеток ($p < 0,05$) при совместном воздействии ДОКС с РАПА или Торином2, при этом доля погибших клеток составляла 64±10,8% и 79±8,4% соответственно по сравнению с 7% погибших клеток в инфицированной популяции без ингибиторов. Совместное действие ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) - LY294002 и ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки приводило к сходному эффекту. Таким образом, подавление всех изученных ферментов пути mTOR увеличивало чувствительность инфицированных клеток к антибиотику. Более сильное цитотоксическое действие Торина2, возможно, объясняется тем, что это соединение ингибирует не только комплекс mTORC1, как это установлено

для РАПА, но также и комплекс mTORC2 в молекулярном пути PI3K/Akt/mTOR.

Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1 в присутствии ингибиторов репликации ЦМВ.

Для оценки влияния вирусных факторов на устойчивость к ДОКС использовали ганцикловир, подавляющий репликацию ДНК ЦМВ и использующийся при лечении ЦМВИ. Через 4 ч, 7 и 14 с.п.и. ЦМВ вносили ДОКС совместно с ганцикловиром (ГАНЦ) в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали 24 ч. Полученные данные показали, что присутствие ГАНЦ не влияло на жизнеспособность клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, к ДОКС (рисунок 6).

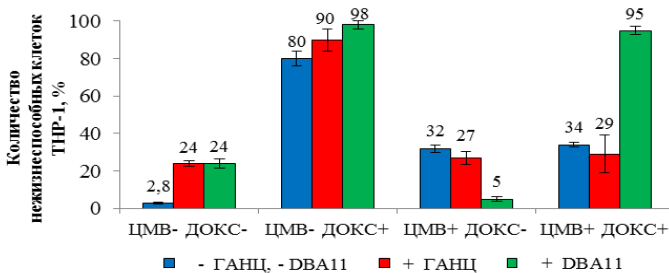


Рис. 6. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1 через 1 с.п.и. ЦМВ в присутствии ГАНЦ и DVA11.

Сохранение устойчивости свидетельствует о том, что присутствие в клетках репликативно-активного ЦМВ не требуется для установления резистентности инфицированных клеток. Кроме того, полученные данные позволяют предположить, что поздние белки ЦМВ, которые синтезируются после репликации вирусного генома, не влияют на установление резистентности клеток ТНР-1 к ДОКС.

Представляло интерес изучить, окажет ли влияние на чувствительность ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1 к ДОКС новое соединение - DVA11, синтезированное в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. DVA11 - димерный флюоресцирующий бисбензимидазол, который специфически связывается с АТ-парами в узкой бороздке ДНК и является эффективным ингибитором топоизомераз-I и II, а также ДНК-хеликаз. Вначале мы показали, что данное соединение проявляет противовирусную активность при заражении чувствительных к ЦМВ фибробластов (ФЛЭЧ). Цитотоксические свойства DVA11 оказались низкими – ЦД₅₀ составляла 1696 мкг/мл, ингибирующая доза при добавлении DVA11 в культуру ФЛЭЧ через 1 ч после заражения составила 30 мкг/мл (индекс селективности - 56,5). Таким образом, моделирование терапевтической активности *in vitro* показало, что изученное соединение умеренно, но значимо подавляет ЦМВИ в высокочувствительных клетках.

Для анализа действия DBA11 на низко чувствительные к ЦМВ опухолевые клетки соединение вносили в концентрации 117 мкг/мл совместно с ДОКС в концентрации 5 мкг/мл в инфицированные и не инфицированные клетки ТНР-1 и инкубировали 24 ч. Результаты использования DBA11 показали, что при совместном действии с ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 происходит восстановление чувствительности опухолевых клеток к действию антибиотика (рисунок 6). Изучение действия DBA11 на активность вирусных генов методом ОТ-ПЦР показало, что в течение 24 ч транскрипционная активность гена *UL123*, кодирующего сверхранний белок IE1-p72, снижалась в 1,7 раз, генов *UL54* *UL55*, кодирующих ранний рр65 и поздний gB белки ЦМВ – приблизительно в 2 раза. Можно предположить, что механизм действия DBA11 включает подавление самых ранних стадий ЦМВИ, предшествующих репликации ДНК ЦМВ.

Повреждения ДНК в инфицированных и неинфицированных клетках ТНР-1 под действием ДОКС. Методом TUNEL выявляли разрывы клеточной ДНК в изученных клетках. Примеры визуализации результатов метода TUNEL приведены на рисунке 7.

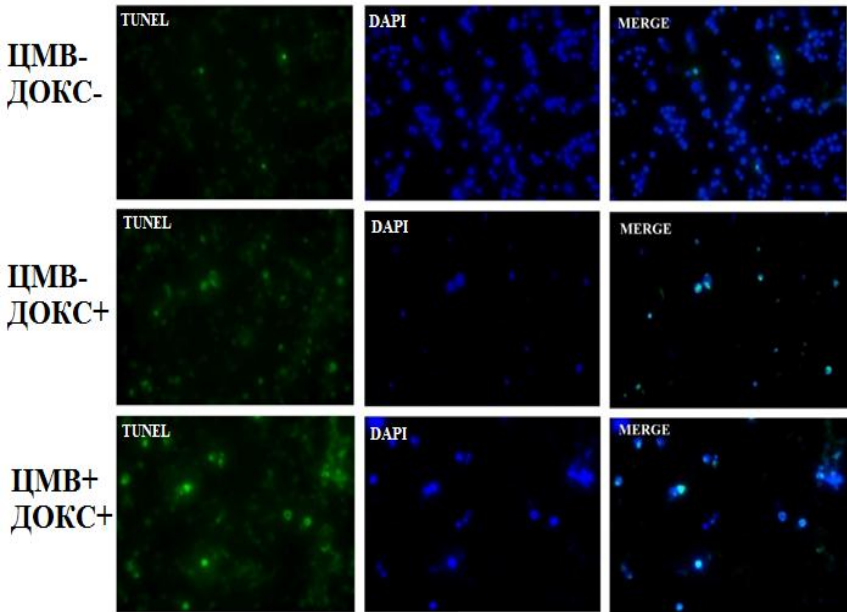


Рис. 7. Выявление фрагментированной ДНК в клетках ТНР-1 после обработки ДОКС. Зеленая флюоресценция – положительная реакция TUNEL, синяя – окраска ядер DAPI, MERGE – совмещение окрасок. Увеличение 400х.

Подсчеты клеток, содержащих метку, показали, что количество TUNEL-позитивных клеток в контрольной культуре было незначительным и составляло $1,15 \pm 0,5\%$. После воздействия ДОКС количество клеток ТНР-1 с фрагментированной ДНК в неинфицированной популяции значительно возросло и достигло $48,3 \pm 4,5\%$, в инфицированной культуре количество TUNEL-позитивных клеток также увеличилось, но в меньшей степени - до $29,3 \pm 7\%$ (рисунок 8).

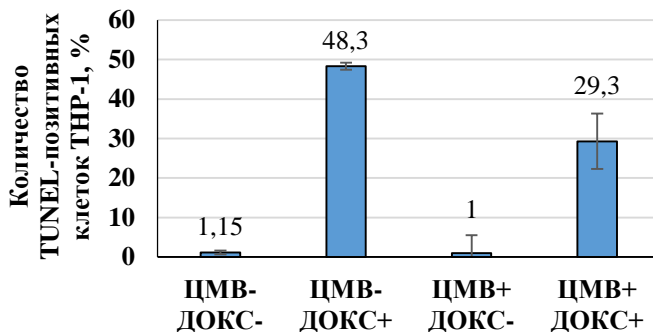


Рис. 8. Изменение количества клеток, содержащих разрывы ДНК, под действием ДОКС в ЦМВ-инфицированной и неинфицированной культурах ТНР-1. Метод TUNEL.

Сравнение полученных данных показывает, что при обработке ЦМВ-инфицированных ТНР-1 ДОКС вызывает разрывы ДНК в 1,6 раз меньшем количестве клеток, чем при тех же условиях в неинфицированных клетках ($p < 0,05$). Таким образом, в клетках ТНР-1 после заражения ЦМВ снижается генотоксическое действие ДОКС.

Оценка доли клеток ТНР-1, содержащих каспазы в ЦМВ инфицированных клетках под действием ДОКС. Для выяснения механизмов гибели клеток ТНР-1 при обработке ДОКС выявляли маркеры программируемой клеточной гибели - апоптоза. В качестве маркеров были изучены активированные формы каспаз 3, 8 и 9 в реакции ИФЛ с использованием специфических антител.

В контрольной - необработанной ДОКС и неинфицированной ЦМВ культуре, было детектировано незначительное количество клеток, содержащих активированные формы каспаз 3, 8 и 9 ($0,8 \pm 0,5\%$; $1,2 \pm 0,5\%$ и $3,1 \pm 2\%$ соответственно). После обработки ДОКС количество неинфицированных клеток, содержащих каспазы 3, 8 и 9, значительно увеличивалось и достигало значений $41,7 \pm 20\%$; $46 \pm 22\%$ и $58,3 \pm 16\%$ соответственно. После воздействия ДОКС на инфицированную популяцию ТНР-1, количество клеток, окрашенных антителами к каспазе 3, составило $12 \pm 6\%$; к каспазе 8 - $14 \pm 7\%$ и к каспазе 9 - $15,5 \pm 3\%$ (рисунок 9).

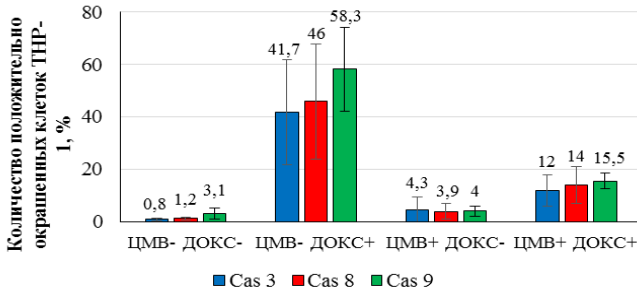


Рис. 9. Количество клеток, содержащих активированные каспазы 3, 8 и 9 в неинфицированных и ЦМВ-инфицированных ТНР-1 после воздействия ДОКС.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в ЦМВ-инфицированных ТНР-1, обработанных ДОКС, доля клеток, содержащих активированные формы каспаз 3, 8 и 9, значительно снижена по сравнению с этим показателем в неинфицированных ТНР-1, обработанных ДОКС (различия статистически значимы, $p < 0,05$). Это указывает на предотвращение апоптоза от действия ДОКС в инфицированной популяции ТНР-1.

Определение изоформ белка р73 в клетках ТНР-1 при ЦМВИ и обработке ДОКС. В лизатах неинфицированных клеток ТНР-1 методом иммуноблота с помощью МКА были выявлены две полосы примерно равной и невысокой интенсивности, по молекулярной массе соответствующие полноразмерной изоформе ТАр73а и укороченной изоформе DНр73а (рисунок 10 А,Б).

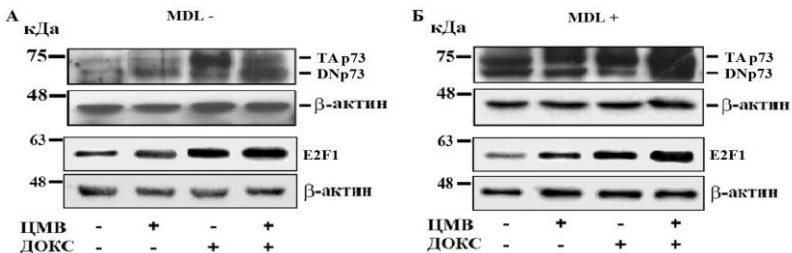


Рис. 10. Относительное содержание полноразмерной ТАр73 и укороченной DНр73 изоформ и транскрипционного фактора E2F1 в клетках ТНР-1 при ЦМВИ и обработке ДОКС (А) в присутствии MDL72.527 (Б).

Мы предположили, что установленная нами устойчивость ЦМВ-инфицированных клеток ТНР-1 к противоопухолевому препарату ДОКС может быть связана с дифференциальной регуляцией изоформ белка р73 и

изменением их баланса под действием вируса. Для проверки этого предположения провели количественную оценку уровней изоформ TAp73 и DNp73 методом иммуноблота в неинфицированных и инфицированных клетках ТНР-1, обработанных ДОКС, а также определили соотношение между ними. Результаты показали, что содержание обеих изоформ в контрольных клетках было низким, а соотношение TAp73/DNp73 составляло $0,86 \pm 0,04$. В инфицированных клетках уровень изоформы DNp73 был значительно повышен, соотношение TAp73/DNp73 составило $0,73 \pm 0,03$ ($p < 0,05$). В неинфицированных клетках ДОКС сместил соотношение в сторону полноразмерной изоформы TAp73, TAp73/DNp73 было равно $1,78 \pm 0,29$ и статистически значимо отличалось от такового в инфицированных клетках, не обработанных ДОКС ($p < 0,05$). Интересно, что в ЦМВ инфицированных клетках, обработанных ДОКС, отмечено небольшое, но статистически значимое увеличение изоформы DNp73, соотношение TAp73/DNp73 уменьшилось до $0,98 \pm 0,07$ ($p < 0,05$) (рисунок 10).

Полученные результаты показали, что в зараженных клетках ТНР-1 повышается содержание укороченной изоформы DNp73, тогда как под действием ДОКС резко увеличивается содержание полноразмерной изоформы TAp73, что приводит к изменению отношения изоформ TAp73/DNp73 в инфицированных клетках, обработанных ДОКС. Следует отметить, что обе изоформы остаются на высоком уровне. Эти данные подтверждают изложенное выше предположение о том, что устойчивость к ДОКС ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1 связана с изменением в соотношении изоформ белка p73.

Количественный анализ транскрипционного фактора E2F1 в клетках ТНР-1, инфицированных ЦМВ и обработанных ДОКС. В связи с имеющимися данными об участии транскрипционного фактора E2F1 в регуляции транскрипции p73 было интересно изучить уровни E2F1 в клетках ТНР-1. Анализ методом иммуноблота показал, что как ЦМВИ, так и ДОКС повышали уровни E2F1 в 1,7 и 2,5 раза соответственно. После инкубации ЦМВ-инфицированных клеток с ДОКС наблюдалось почти 6-кратное увеличение содержания E2F1 (рисунок 10А).

Эти результаты позволяют предположить, что путь E2F1/p73 является одним из ключевых механизмов хеморезистентности к ДОКС ЦМВ инфицированных клеток ТНР-1.

Влияние MDL72.527 на содержания транскрипционного фактора E2F1 в клетках, зараженных ЦМВ при обработке ДОКС. Для выявления влияния метаболизма полиаминов на чувствительность клеток ТНР-1 к ДОКС при ЦМВИ был использован ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527. Инкубация клеток ТНР-1 с MDL72.527 в течение 24 ч снижала уровни E2F1 как в контрольных клетках в 1,8 раза, так и в неинфицированных клетках, обработанных ДОКС - в 1,6 раза. В

инфицированных клетках, обработанных ДОКС, уровень E2F1 в присутствии MDL72,527 оставался очень высоким, превышая уровень контрольных клеток, обработанных ингибитором, почти в 9 раз (рисунок 10).

Изменение соотношения TAp73/DNp73 под действием MDL72.527.

Инкубация с MDL72.527 привела к значительному увеличению содержания изоформы TAp73 (рисунок 10) и, соответственно, увеличению отношения TAp73/DNp73 как в контрольных и ЦМВ инфицированных клетках, так и в клетках, обработанных ДОКС.

Полученные данные указывают на то, что MDL72.527 восстанавливает чувствительность клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, к ДОКС за счет значительного увеличения активности E2F1 при воздействии на молекулярный путь E2F1/p73.

Комбинированное использование ДОКС с ингибиторами клеточного метаболизма.

ДОКС, несмотря на высокую противоопухолевую эффективность, имеет высокую токсичность. Поэтому представляло интерес проверить, позволит ли совместное использование ДОКС и ингибиторов клеточного метаболизма снизить цитотоксичность препарата, не снижая эффективности химиотерапии. Для этого провели шахматное титрование с использованием трех концентраций ДОКС (5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл и 1,25 мкг/мл) и трех концентраций каждого ингибитора: MDL72.527 – 20 мкМ/мл, 10 мкМ/мл и 5 мкМ/мл; рапамицина – 9 мкМ/мл, 4,5 мкМ/мл и 2,25 мкг/мл и Торина2 – 0,1 мкМ/мл, 0,05 мкМ/мл и 0,025 мкг/мл.

Было показано, что используемые концентрации соединений (MDL72.527 20мкМ/мл, Торина2 0,05 мкг/мл), вызывающие гибель 20% клеток ТНР-1 и восстанавливающие чувствительность ЦМВ инфицированных клеток к ДОКС, позволяли снизить используемую концентрацию антибиотика (5 мкг/мл) в 2 раза без снижения эффективности действия на инфицированные опухолевые клетки. Использование РАПА в концентрации 9 мкг/мл позволило снизить концентрацию ДОКС в 4 раза с сохранением восстановления чувствительности ЦМВ инфицированных клеток к антибиотику. Снижение резистентности инфицированных клеток также наблюдалось при совместном использовании ДОКС и Торина2 в концентрациях 2,5 мкг/мл и 0,025 мкг/мл, соответственно, а также при снижении концентрации ДОКС в 2 раза и РАПА в 2-4 раза.

На основании полученных данных можно заключить, что ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527 и ингибиторы mTOR – РАПА и Торин2 являются не только перспективными препаратами, позволяющими преодолеть резистентность опухолевых клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, к действию антибиотика ДОКС, но и позволяют снизить используемые концентрации высокотоксичного химиопрепарата в 2-4 раза с сохранением эффективности его действия.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный количественный анализ вирусной ДНК, мРНК, белков и инфекционной активности ЦМВ показал, что в клетках лейкемии человека ТНР-1 ЦМВ инфекция имеет абортивный характер и характеризуется активной формой (1 с.п.и.), переходной формой (7 с.п.и.) и латентной формой (14 с.п.и.) без продукции вируса на всех стадиях инфекции.

2. На модели гематологической опухоли – клеток лейкемии ТНР-1, впервые показано, что заражение ЦМВ вызывает устойчивость к цитотоксическому действию ДОКС как при активной, так и при латентной форме инфекции.

3. Впервые показано, что в инфицированных ЦМВ клетках ТНР-1 предотвращались разрывы ДНК при действии ДОКС и в 4 раза снижалась экспрессия маркеров апоптоза - активированных форм каспаз 3, 8 и 9, по сравнению с неинфицированными опухолевыми клетками.

4. Количественный анализ двух изоформ белка p73 - полноразмерной TAp73 и укороченной DNp73 – впервые показал, что в клетках ТНР-1, инфицированных ЦМВ, под действием ДОКС происходит смещение изоформ в сторону антиапоптозной изоформы DNp73 и 6-ти кратное повышение содержания транскрипционного фактора E2F1.

5. Впервые показано, что ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527 восстанавливает чувствительность к ДОКС клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ. Преодоление резистентности сопровождается увеличением соотношения TAp73/DNp73 и повышением уровня E2F1 в 9 раз.

6. Установлено снижение жизнеспособности клеток ТНР-1, инфицированных ЦМВ, под действием ДОКС в присутствии ингибиторов PI3K - LY294002 и mTOR - рапамицина и Торина2, что указывает на участие молекулярного пути PI3K/Akt/mTOR в формировании устойчивости к ДОКС клеток ТНР-1, активно и латентно инфицированных ЦМВ.

7. Впервые показано, что димерный бисбензимидазол DBA11, специфически взаимодействующий с ДНК, подавляет транскрипционную активность сверххранного гена ЦМВ *UL123* и повышает гибель инфицированных клеток ТНР-1 под действием ДОКС, указывая на участие вирусного гена в восстановлении чувствительности опухолевых клеток к действию антибиотика.

8. Комбинированное применение ДОКС и ингибиторов метаболизма клеток (цикла биогенных полиаминов и пути mTOR) позволило в 2-4 раза снизить действующие концентрации соединений при сохранении эффективности восстановления чувствительности клеток ТНР-1 к ДОКС.

Практические рекомендации

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности диагностики ЦМВИ у пациентов с гематологическими опухолями, у которых терапия противоопухолевыми препаратами оказалась неэффективной. Мониторинг маркеров ЦМВИ позволит оценить прогностическое значение терапии и своевременно принять решение об изменении курса с учетом анти-ЦМВ подходов. Определение изоформ белка p73 и выявление сдвига в сторону DNp73 в опухолевых клетках, содержащих ЦМВ, будет способствовать выбору оптимальных терапевтических стратегий для людей со злокачественными заболеваниями системы крови, а также оптимизировать индивидуальный подход при лечении опухолей.

Комбинированное применение ДОКС с ингибиторами катаболизма полиаминов, а также с ингибиторами mTOR, представляет новую стратегию для лечения лейкемии у ЦМВ инфицированных и неинфицированных пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Климова. Р.Р. Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах / Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., **Чернорыж Я.Ю.**, Коваль В.С., Иванов А.А., Жузе А.Л., Куц А.А. // Вопросы вирусологии. - 2017. – Т.62. - №4. - С.162-168

2. Емельянова С.С. Участие транскрипционных факторов E2F1 и p73 в формировании резистентности к доксорубину опухолевых клеток ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом человека. / Емельянова С.С., **Чернорыж Я.Ю.**, Юрлов К.И., Федорова Н.Е., Иванов А.В., Кочетков С.Н., Вербенко В.Н., Куц А.А., Виноградская Е.Р. // Цитология. – 2018. – Т.60. – №7. – С.527-530.

3. Fedorova N.E. Inhibitor of polyamine catabolism MDL72.527 restores the sensitivity to doxorubicin of monocytic leukemia THP-1 cells infected with human cytomegalovirus. / Fedorova N.E., **Chernoryzh Y.Y.**, Vinogradskaya G.R., Emelianova S.S., Zavalysheva L.E., Yurlov K.I., Zakirova N.F., Verbenko V.N., Kochetkov S.N., Kushch A.A., Ivanov A.V. // Biochimie. – 2019. – №158. – С.82-89.

4. **Чернорыж Я. Ю.** Резистентность клеток лейкемии ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом, к противоопухолевому антибиотику доксорубину и восстановление чувствительности ингибиторами молекулярного пути PI3K/AKT/mTOR. / **Чернорыж Я. Ю.**, Федорова Н. Е., Юрлов К. И., Симонов Р. А., Корнев А. Б., Карпов Д. С., Закирова Н. Ф., Иванов А. В., Куц А. А., Гинцбург А. Л. // Доклады академии наук. – 2019. Т.489. – №4. – С.433–437.

5. **Чернорыж Я.Ю.** Ингибиторы mTOR снимают блок апоптоза, вызванный ЦМВ инфекцией опухолевых клеток ТНР-1, обработанных доксорубицином. / **Чернорыж Я.Ю.**, Федорова Н.Е., Корнев А.Б., Иванов А.В., Куц А.А. // Вестник «Биомедицина и социология». – 2018. – Т.3. – №4. – С.45-48.

6. **Чернорыж Я.Ю.** Сочетанное применение противоопухолевого антибиотика доксорубицина и ингибитора mTOR — рапамицина восстанавливает чувствительность клеток лейкемии ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом, и снижает цитотоксичность доксорубицина. / **Чернорыж Я.Ю.**, Федорова Н.Е., Юрлов К.И., Иванов А.В., Куц А.А. // Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий»: Сб. трудов Конференции, Санкт-Петербург, 8-11 октября 2019 г. – Гены и клетки, 2019. – Т.14. – №3. – С.70.

7. **Чернорыж Я.Ю.** Негативное влияние цитомегаловируса на чувствительность опухолевых клеток ТНР-1 к действию противоопухолевого антибиотика доксорубицина. / **Чернорыж Я.Ю.**, Юрлов К.И. // XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»: Сб. трудов Конференции, Москва, 10-14 апреля 2017 г. – М.: МАКС Пресс, 2017.

8. Емельянова С.С. Ассоциация развития устойчивости опухолевых клеток ТНР-1 к химиотерапии под действием цитомегаловируса с изменением баланса изоформ белка p73. / Емельянова С.С., **Чернорыж Я.Ю.**, Юрлов К.И., Федорова Н.Е., Куц А.А., Иванов А.В., Кочетков С.Н., Вербенко В.Н., Виноградская Г.Р. // IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии: Сб. трудов Конференции, Москва, 17-19 декабря 2018 г. - М.: Успехи молекулярной онкологии, 2018 – С.146.

9. **Чернорыж Я.Ю.** Восстановление чувствительности к доксорубицину лейкемических клеток ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом, под действием ингибитора полиаминов MDL72.527 / **Чернорыж Я.Ю.**, Закирова Н.Ф., Смирнова О.А., Емельянова С.С., Юрлов К.И., Федорова Н.Е., Виноградская Г.Р., Вербенко В.Н., Иванов А.В. // IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии: Сб. трудов Конференции, Москва, 17-19 декабря 2018 г. - М.: Успехи молекулярной онкологии, 2018 – С.105.

10. Виноградская Г.Р. Восстановление чувствительности к доксорубицину инфицированных цитомегаловирусом клеток моноцитарной лейкемии ТНР-1 под воздействием ингибитора полиаминового катаболизма MDL 72.527 / Виноградская Г.Р., Федорова Н.Е., **Чернорыж Я.Ю.**, Емельянова С.С., Завалишина Л.Е., Юрлов К.И., Закирова Н.Ф., Вербенко В.Н., Кочетков С.Н., Куц А.А., Иванов А.В. // международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные

симпозиумы»: Сб. трудов Конференции, Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019 г. – СПб.: ВВМ, 2019 – С.793.

11. **Чернорыж Я.Ю.** Сверххранение белки цитомегаловируса участвуют в установлении резистентности к противоопухолевому антибиотику доксорубину инфицированных клеток лейкемии ТНР-1 / **Чернорыж Я.Ю.**, Юрлов К.И., Симонов Р.А., Федорова Н.Е., Куш А.А. // VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика»: Актуальная биотехнология. – 2019. – Т.30. – №3. – С. 385-388.

12. Емельянова С.С. Цитомегаловирус индуцирует устойчивость опухолевых клеток ТНР-1 к химиотерапии, влияя на метаболизм полиаминов / Емельянова С.С., **Чернорыж Я.Ю.**, Юрлов К.И., Закирова Н.Ф., Виноградская Г.Р., Вербенко В.Н. // VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика»: Актуальная биотехнология. – 2019. – Т.30. – №3. – С.581-584.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ – антитела

БОЕ – бляшкообразующая единица

ВСЖ – вируссодержащая жидкость

ГАНЦ – ганцикловир

ДОКС – доксорубин

ИФЛ – иммунофлуоресцентная окраска

МКА – моноклональные антитела

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

РАПА – рапамицин

ФЛЭЧ – фибробласты легкого эмбриона человека

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЦМВ – цитомегаловирус человека

ЦМВИ – цитомегаловирусная инфекция

ЭФ – электрофорез