

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ EXPERIMENTAL RESEARCHES

ДЕЙСТВИЕ «РАННИХ» БЕЛКОВ E2, E6 И E7 ПАПИЛЛОМАВИРУСА ВЫСОКОКАНЦЕРОГЕННОГО ТИПА ВПЧ16 НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ HeLa, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ РАЗРАСТАНИЯ В ЛЁГКИХ У МЫШЕЙ

Салаяев Р.К.,
Рекославская Н.И.

ФГБУН Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
(664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Рекославская Наталья Игоревна,
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

РЕЗЮМЕ

Целью работы было изучение возможности создания растительной пероральной терапевтической вакцины против рака при использовании антигенного белка ВПЧ16 E2, кодируемого «ранним» геном *hvp16 E2*. Для этого исследовали опухоли в лёгких у мышей после инокуляции с раковыми клетками HeLa, а также лёгкие после вакцинации белком ВПЧ16 E2. При этом анализировали индукцию иммуногенеза Т-лимфоцитов у мышей при действии вакцины на основе антигенного белка ВПЧ16 E2.

Материалы и методы. В работе использовали раковые клетки HeLa, периферические мононуклеарные клетки крови, спленоциты и изолированные лёгкие у мышей. Индукцию иммунного клеточного ответа оценивали методом Элиспот.

Результаты. «Ранние» онкогенные белки ВПЧ16 E6 и E7 не влияли на рост раковых клеток HeLa *in vitro*. При внесении «раннего» ВПЧ16 E2 в суспензию клеток HeLa происходило их моментальное разрушение, фиксируемое трипановым синим. В тканях изолированных лёгких у мышей после инокуляции с HeLa были обнаружены 4 типа опухолей: 1 – округлые периферические опухоли, 2 – центральные опухоли в области трахеальной карины, 3 – пневмониеподобные опухоли с гиперхромными ядрами на долях лёгких, сходные с круглоклеточной саркомой мягких тканей дыхательных путей, и 4 – опухоли, подобные раку Пенкаста в верхних долях лёгких. При вакцинации белком ВПЧ16 E2 в присутствии клеток HeLa были выявлены паттерны нормальных тканей лёгких. В крови и спленоцитах вакцинированных мышей выявлено высокое содержание Т-клеточного рецептора (TCR), γ -интерферона, CD4/CD8-Т-лимфоцитов, а также ферментов апоптоза: гранзима В, перфорины и гранулизина.

Закключение. Исследование перспективно для разработки пероральной терапевтической вакцины на основе растительной экспрессионной системы (томаты) с антигенным белком ВПЧ16 E2 против рака лёгких, рака шейки матки и других типов рака.

Ключевые слова: клетки HeLa, ВПЧ16 E2, индукция опухолей лёгких у мышей, γ -интерферон, Т-клеточный рецептор, CD4/CD8-Т-лимфоциты, гранзим В, гранулизин, перфорин, регрессия опухолей

Статья получена: 17.03.2022
Статья принята: 01.06.2022
Статья опубликована: 05.07.2022

Для цитирования: Салаяев Р.К., Рекославская Н.И. Действие «ранних» белков E2, E6 и E7 папилломавируса высококанцерогенного типа ВПЧ16 на раковые клетки HeLa, вызывающие опухолевые разрастания в лёгких у мышей. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(3): 260-276. doi: 10.29413/ABS.2022-7.3.26

THE EFFECT OF “EARLY” PROTEINS E2, E6 AND E7 OF PAPILLOMAVIRUS OF HIGH-RISK CANCEROGENOUS TYPE HPV16 ON CANCER HeLa CELLS, INDUCING TUMOUR GROWTHS IN MICE LUNGS

Salyaev R.K.,
Rekoslavskaya N.I.

Siberian Institute of Plant
Physiology and Biochemistry SB RAS
(Lermontova str. 132, Irkutsk 664033,
Russian Federation)

Corresponding author:
Natalya I. Rekoslavskaya,
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

ABSTRACT

The goal of investigation was the development of oral therapeutic vaccine against cancer on basis of antigenic regulatory protein HPV16 E2 encoded by the “early” hpv16 E2 gene.

The aim. *To study tumour growths in mice lungs inoculated with cancer HeLa cells and then vaccinated with vaccine material of transgenic tomato with the gene/protein HPV16 E2, and to study the activation of the immunogenesis of T-lymphocytes in mice after oral vaccination with HPV16 E2.*

Materials and methods. *Proliferating cancer HeLa cells, mice peripheric blood mononuclear cells, splenocytes, intact and isolated lungs of mice were used in the study. Elispot was used for the evaluation of increasing of immunogenicity.*

Results. *“Early” proteins HPV16 E6 or HPV16 E7 did not reveal any effect on HeLa cells. The regulatory antigenic “early” protein HPV16 E2 drastically degraded HeLa cells recorded by trypane blue. Four types of tumours were found in mice lung lobes placed in the suspension of cancer HeLa cells for 2–5 days: 1 – peripheral round tumours on epithelium, 2 – central tumours in the area of tracheal carina, 3 – pneumonia-like peripheral cancer on lung lobes which was very similar to small-round-cell lung sarcoma with hyperchromic nuclei and 4 – Pancoast-like cancer in apical parts of lung lobe. Patterns of normal developed lung tissues were viewed on slices of lungs infected with HeLa in the presence of E2 simultaneously. The very high contents of γ -interferon, CD4/CD8 T lymphocytes, T cell receptor and apoptotic enzymes: granzyme B, perforin and granulysin – were detected in blood and splenocytes of mice vaccinated with HPV16 E2.*

Conclusion. *The study is promising for the development of an oral therapeutic vaccine based on a plant expression system (tomatoes) with the HPV16 E2 antigenic protein against lung cancer, cervical cancer and other types of cancer.*

Key words: *cancer HeLa cells, HPV16 E2, the induction of tumour lungs in mice, γ -interferon, T cell receptor, CD4/CD8 T lymphocytes, granzyme B, perforin, granulysin*

Received: 17.03.2022
Accepted: 01.06.2022
Published: 05.07.2022

For citation: Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I. The effect of “early” proteins E2, E6 and E7 of papillomavirus of high-risk cancerogenous type HPV16 on cancer HeLa cells, inducing tumour growths in mice lungs. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(3): 260-276. doi: 10.29413/ABS.2022-7.3.26

ОБОСНОВАНИЕ

По данным Международного агентства по исследованиям рака (International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2020 при ВОЗ), в 2020 г. ежегодный прирост заболеваемости раком составил 19,3 млн человек, из которых 10,0 млн умерло [1]. На долю рака шейки матки приходится 0,7 млн смертей, а от рака лёгких скончалось около 2,2 млн человек. Рак лёгких является трудноизлечимым заболеванием: только 15 % больных удаётся выздороветь. Предполагается, по прогнозам ВОЗ, что прирост заболеваний рака в ближайшее десятилетие увеличится, по меньшей мере на 50 % [1]. Создаются различные вакцины против рака, но ни одна из них не получила официального признания.

Раковые клетки HeLa являются причинным агентом рака шейки матки и ряда других типов рака. Но в отношении развития опухолей лёгких таких сведений в литературе нет. В составе генома клеток HeLa содержится до 6 геномов папилломавируса высококанцерогенного типа ВПЧ18. Канцерогенез, вызываемый папилломавирусами, обусловлен экспрессией двух «ранних» онкогенов ВПЧ E6 и ВПЧ E7 (от англ. early – ранний), которые кодируют «ранние» онкобелки E6 и E7, обеспечивающие разнообразные нарушения в геноме хозяйских клеток, приводящие к раку, после интеграции папилломавируса в клетки человека [2]. В то же время в геноме папилломавирусов присутствует «ранний» ген ВПЧ E2, кодирующий «ранний» белок E2, являющийся блокатором экспрессии онкогенов E6 и E7 и суперсупрессором опухолевого роста [3]. Но при интеграции белок E2 разрушается и не встраивается в геном клеток хозяина.

Представлялось интересным изучить действие «ранних» белков высококанцерогенного типа папилломавируса ВПЧ16 на раковые клетки HeLa.

В своей работе по созданию терапевтической вакцины против рака шейки матки нами была создана модельная система на мышах для изучения действия раковых клеток HeLa. Впервые было получено опухолеобразование семенников у самцов мышей и опухолеобразование в лёгких, как у самцов, так и у самок мышей, после инъекции раковых клеток HeLa в бедренную мышцу [4]. В связи с полученными данными, задачами работы было изучение и сравнение действия «ранних» белков на клетки HeLa *in vitro* при их внесении в клеточные культуры, а также анализ суперсупрессорного антиканцерогенного действия «раннего» белка E2 на опухоли интактных и изолированных лёгких, возникших в присутствии раковых клеток HeLa, которое, по-видимому, могло быть опосредовано индукцией иммунного клеточного ответа.

МЕТОДЫ

Белые конвенциональные (беспородные) лабораторные мыши для экспериментов были получены из вивария Восточно-Сибирского института медико-экологических исследований (г. Ангарск). Работа с мышами была одобрена на заседании биоэтического совета ФБГНУ СИ-

ФИБР СО РАН (протокол заседания № 9 от 30.10.2019). При содержании мышей соблюдали стандартные условия, прописанные в ГОСТ 33215-2014, 33216-2014.

Раковые клетки HeLa получали из фирмы «Биолот» (г. Санкт-Петербург). Содержание, выращивание и криосохранение производили в соответствии с рекомендациями фирмы. Для экспериментов использовали питательную среду DMEM с добавлением 10%-й сыворотки плодов коровы («Биолот») и антибиотиков: 500 ед./мл пенициллина G и 50 мг/л стрептомицина. Для изучения индукции опухолеобразования инъектировали 100 мкл свежеевыращенной суспензии клеток HeLa в бедренную мышцу мышей. После этого мышей оставляли жить, так как они были вполне жизнеспособными в течение 2–3 месяцев, в течение которых производили вакцинирование и последующее их выращивание. Для экспериментов лёгкие выделяли из мышей, сразу помещали в суспензию клеток HeLa и проводили мониторинг опухолеобразования. Появляющиеся опухоли в лёгких окрашивали либо азур-эозином по Романовскому, либо анализировали на микротомных срезах после процедур стандартного обезживания, парафинирования и окраски гематоксилином по Carazzi согласно методикам, опубликованным в [5]. Срезы получали с помощью санного микротомы (Союзмедпром, СССР).

Синтез «ранних» белков ВПЧ16 E2, E6 и E7 осуществляли в растительной экспрессионной системе по ранее опубликованному методу [6], при этом выход антигенных белков ВПЧ16 составлял 25–30 мкг/мг общего растворимого белка. Количественное определение антигенных «ранних» белков E2, E6 и E7 проводили с помощью иммуноферментного анализа [6, 7] при использовании следующих первичных антител как стандартов: HPV16 E2 Antibody (TVG 261, sc-53336) (Santa Cruz Biotechnology Inc., США), HPV16 E6/18 E6 Antibody (C1P5, sc-460) (Santa Cruz Biotechnology Inc., США), Papillomavirus 16 E7 Antibody [SPM405] (GenWay Biotech Inc., США).

Анализ индукции синтеза антител после вакцинации мышей вакцинным материалом плодов с генами ВПЧ16 E2, E6 и E7 проводили иммуноферментным методом (ИФА) [7]. Для этого ИФА анализа было взято следующее количество мышей: $n = 50$ – для ВПЧ16 E2, $n = 20$ – для ВПЧ16 E6 и $n = 25$ – для ВПЧ16 E7. Перекрытие последовательностей генов E6 и E7 в геноме папилломавируса позволило использовать антитела к ВПЧ16 E7 (Papillomavirus 16 E7 [SPM405] Antibody, GenWay Biotech Inc., США) также и для иммуноферментного анализа содержания ВПЧ16 E6. Стандартный раствор HPV16 E7 (Human Papillomavirus, Type 16, Oncoprotein E7, GWPB-1F6914, GenWay Biotech Inc., США) был использован в работе для определения количества E7 и E6 в иммуноферментном анализе.

Выделение лимфоцитов из периферической крови мышей, из селезёнки и процедуру Элспот проводили согласно ранее опубликованным методам [8]. При изготовлении фотографий клеток и органов использовали цифровую фотокамеру, световой микроскоп и видеокамеру Levenhuk C310 NG (Levenhuk Ltd, США) с разрешением 2048-1536 пс с приложенным к ней программным обеспечением. Для подсчёта «пятен» на нитроцеллюлозной мембране, окрашенных после взаимодействия

генераций Т-лимфоцитов с соответствующими первичными/вторичными антителами и их субстратами, использовали компьютерную программу ACDSee (версия 16).

При анализе Элиспот использовали первичные антитела фирмы Abscam (Великобритания) к соответствующим антигенам: на γ -интерферон – rabbit monoclonal [EPR1108] to interferon gamma (AB133566), моноклональные кроличьи антитела к CD4 Anti-CD4 antibody [EPR19514] (AB183685) recombinant rabbit monoclonal, к CD8 – Anti-CD8 alpha antibody [EPR21769] (AB217344) recombinant rabbit monoclonal [EPR19514], антитела на ферменты апоптоза: на гранзим В – rabbit polyclonal Anti-Granzyme B (AB53097), на перфорин – rat monoclonal Anti-Perforin antibody [CB5.4] (AB16074), Anti-T-Cell Receptor antibody (JOVI.1) (AB5465) mouse monoclonal, на гранулизин – Anti-Human Granulysin (AB213787) monoclonal. В качестве вторичных использовали козьи антитела с привитой щелочной фосфатазой и субстрат/окислитель BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат/нитротетразолий синий) (Sigma, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Анализ индукции антительного ответа на «ранние» белки ВПЧ16 E2, E6 и E7, развитые в сыворотке крови мышей, перорально вакцинированных материалом плодов томата с этими вирусными антигенами белками

Небольшой геном папилломавируса, около 8 тпн, кодирует ограниченное количество белков. Из экспресси-

руемых с «раннего» промотора p97 «ранних» белков наибольший интерес представляют E2, E6 и E7. С «позднего» промотора p670 экспрессируются «поздние» белки оболочки L1 и L2. После установления критической роли онкобелка ВПЧ16 E6 как блокатора антиканцерогенного белка p53 (а для онкобелка ВПЧ16 E7 показано связывание с белком pRb, приводящее к активации пролиферации клеток) основные усилия исследователей были направлены на разработку терапевтической противораковой вакцины на основе антител на онкобелок ВПЧ16 E7 или в сочетании ВПЧ16 E6/E7. Но до настоящего времени не были зарегистрированы терапевтические вакцины на основе антител к E6/E7.

Работу по изучению возможности создания пероральной терапевтической вакцины мы также начали с получения антител к «ранним» белкам ВПЧ16 E2, E6 и E7 в сыворотке крови мышей.

Все три антигенных «ранних» белка ВПЧ16 E2, E6 и E7 выявили высокую активность в индукции синтеза антител, развивая экстинкции при ИФА свыше 3 ед. коэффициента экстинкции. Особенно эффективной была индукция антител антигенным белком ВПЧ16 E7, так как окраска в лунках планшеты ИФА после инкубации с первичными и вторичными антителами начинала развиваться сразу в течение первой минуты после добавления красящего субстрата ортофенилендиамина и давала плотное тёмно-коричневое окрашивание уже через 5 минут инкубации.

На рисунке 1 представлен характерный ИФА активности синтеза антител в сыворотках крови 25 мышей, перорально вакцинированных вакцинным мате-

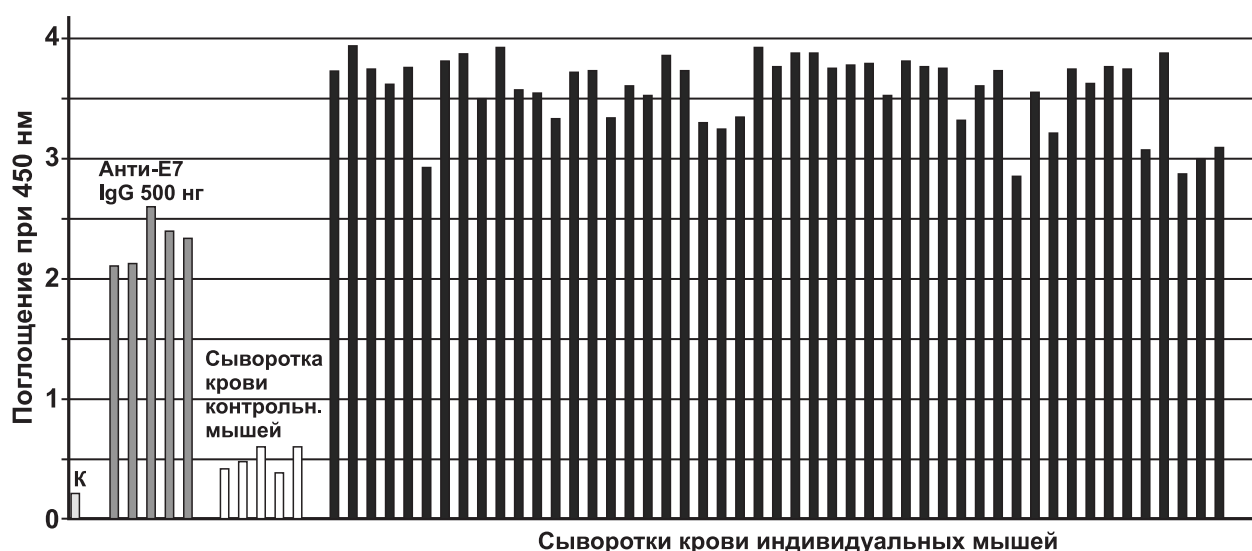


РИС. 1.

ИФА содержания антител к ВПЧ16 E7 в сыворотке крови мышей ($n = 25$), перорально вакцинированных 500 мкг ВПЧ16 E7 в составе вакцинного материала плодов томата, трансгенного по гену *hvp16 E7*: К – контроль фона; Анти-E7 IgG 500 нг – пример взаимодействия стандартных антител 500 нг с 5 мкг стандартного белка HPV16 E7 ($n = 5$); сыворотка крови контрольных мышей ($n = 5$); сыворотки крови индивидуальных вакцинированных мышей ($n = 25$) даны в двух аналитических повторностях

FIG. 1.

ELISA of the content of antibodies to HPV16 E7 in the blood serum of mice ($n = 25$) orally vaccinated with 500 μ g of HPV16 E7 as part of the vaccine material of tomato fruits transgenic for the *hvp16 E7* gene: К – background control; Anti-E7 IgG 500 ng – the result of the reaction of standard antibody 500 ng with 5 mkg of standard protein HPV16 E7 ($n = 5$); control serum blood mice ($n = 5$); serum of vaccinated individual mice ($n = 25$) were analyzed in 2 replicates

риалом плодов томата с белком ВПЧ16 Е7. Можно видеть, что синтез антител после вакцинирования мышей с 500 мкг ВПЧ16 Е7 был практически равномерным, и экстинкция была выше, чем при взаимодействии 500 нг стандартных антител к ВПЧ16 Е7 (Papillomavirus 16 Е7 [SPM405] Antibody, GenWay Biotech Inc., США) и 5 мкг стандартного раствора HPV16 Е7 (Human Papillomavirus, Type 16, Oncoprotein Е7, GWPB-1F6914, GenWay Biotech Inc., США). В крови контрольных мышей антител к ВПЧ16 Е7 обнаружено не было, по данным ИФА.

Принимая во внимание высокий синтез антител в сыворотке крови мышей перорально вакцинированных вакцинным материалом плодов томата с ВПЧ16 Е7, было решено испытать действие вакцины с Е7 на аногенитальную опухоль самки мышей размером в диаметре 12 мм. В первые 3–5 суток после перорального вакцинирования с ВПЧ16 Е7 действительно произошло уменьшение размеров опухоли на 40 %. Но после десятого дня вакцинирования в основании опухоли стали разрастаться дочерние опухоли. Поэтому испытания прекратили.

По-видимому, высокий синтез антител не был критичным для опухоли, а вакцина на основании антителного ответа представилась малоперспективной. С другой стороны, если в суспензию раковых клеток HeLa вводили сыворотку мышей, вакцинированных ВПЧ16 Е2, то происходило довольно быстрое (в течение первой ми-

нуты) разрушение этих клеток, регистрируемое по окрашиванию трипановым синим (ТС).

2. Анализ действия «ранних» белков ВПЧ16 Е2, Е6 и Е7 на клетки HeLa

Как можно видеть на рисунке 2, клетки HeLa, хранящиеся в низкотемпературном морозильнике при -61°C , росли и делились (рис. 2а) при их культивировании в питательной среде DMEM с 10 % сыворотки плодов коровы. Об их высокой функциональной активности свидетельствует интенсивная окраска нитротетразолием синим (NBT, nitroblue tetrazolium), прижизненным митохондриальным красителем (рис. 2б). Трипановый синий (ТС), окрашивающий мёртвые клетки вследствие нарушения мембран, не взаимодействовал с живыми клетками HeLa (рис. 2в). Если в питательную среду вводили «ранний» белок ВПЧ16 Е2, клетки HeLa практически моментально разрушались, и под микроскопом на таких препаратах были видны обломки клеток, которые хорошо прокрашивались ТС (рис. 2г). В присутствии ВПЧ16 Е6 клетки HeLa не прокрашивались ни NBT (рис. 2д), ни ТС (рис. 2е). При добавлении ВПЧ16 Е7 клетки HeLa теряли адгезивность, то есть плавали в суспензии во флаконе, не оседая на дно, но также не прокрашивались ни NBT (рис. 2ж), ни ТС (рис. 2з). Поскольку только «ранний» белок ВПЧ16 Е2 оказал существенное влияние на клетки HeLa, дальнейшая экспериментальная работа проводилась с этим «ранним» белком.

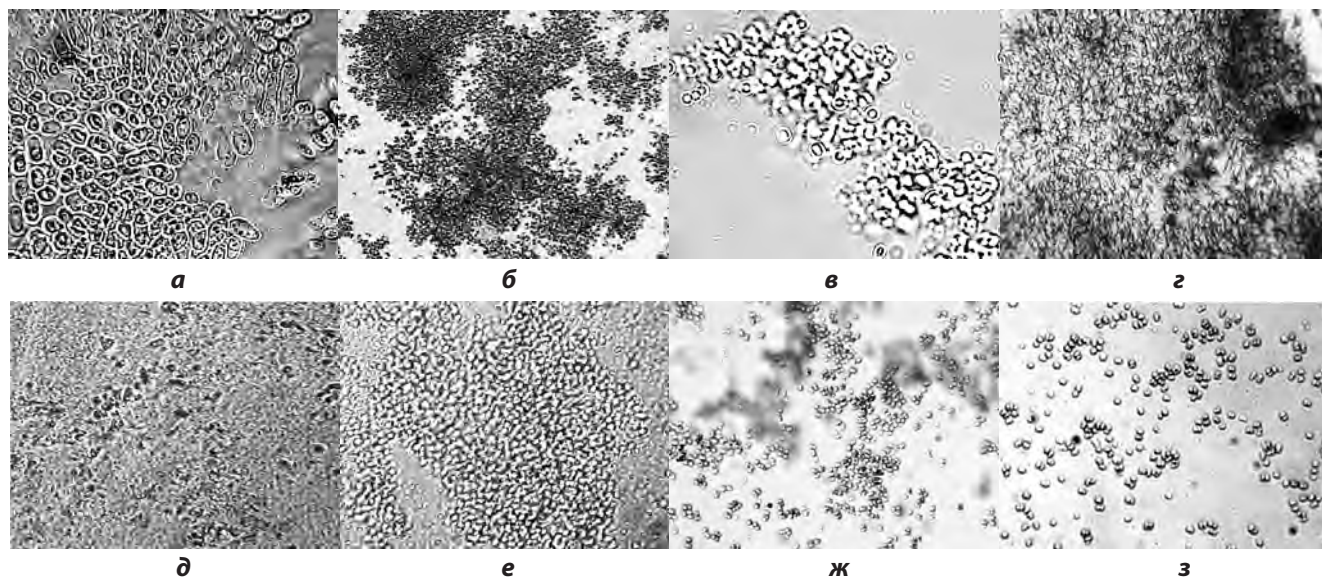


РИС. 2.

Действие «ранних» белков ВПЧ16 Е2, Е6 и Е7 на раковые клетки HeLa: **а** – клетки свежесозданной суспензии HeLa; **б** – окрашивание клеток HeLa с NBT; **в** – отсутствие окраски с ТС; **г** – полное разрушение клеток HeLa и прокрашивание с ТС после добавления ВПЧ16 Е2; **д** – отсутствие окрашивания клеток HeLa с NBT в присутствии ВПЧ16 Е6; **е** – отсутствие окрашивания клеток HeLa в присутствии «раннего» белка ВПЧ16 Е6 и ТС; **ж** – отсутствие окрашивания клеток HeLa с NBT при добавлении ВПЧ16 Е7; **з** – отсутствие окрашивания клеток HeLa с ТС при добавлении ВПЧ16 Е7. Световой микроскоп, увеличение $\times 360$. Разрешение видеокамеры с программным обеспечением Levenhuk (США) 2048–1536 пс

FIG. 2.

The effect of the “early” proteins HPV16 E2, E6 and E7 on cancer HeLa cells: **a** – cells of fresh grown suspension of HeLa cells; **b** – HeLa cells stained with NBT; **c** – the absence of staining of HeLa cells with TB (trypan blue); **d** – the full destruction of HeLa cells and staining with TB after the addition of the HPV16 E2; **e** – the absence of staining of HeLa cells with NBT in the presence of the “early” protein HPV16 E6; **f** – the absence of staining of HeLa cells in the presence of the “early” protein HPV16 E6 and TB; **g** – the absence of staining of HeLa cells with NBT in the presence of HPV16 E7; **h** – the absence of staining of HeLa cells with TB in the presence of HPV16 E7. Light microscope, magnification $\times 360$. The resolution of video camera with program Levenhuk (USA) 2048–1536 pc

3. Индукция образования опухолей в лёгких при действии раковых клеток HeLa

Инъекцию клеток HeLa делали самцам и самкам мышей обоего пола в возрасте 6–7 месяцев с нормальным развитием и средней массой около 40 г в трёх независимых и отдельных для каждого пола экспериментах, в которых было задействовано по 25 особей. Мыши переносили введение 100 мкл суспензии клеток HeLa без заметных напряжений, естественный отсев не превышал 5–6 %. После инъекции мыши продолжали обычную жизненную активность, хорошо питались и вели нормальный образ жизни.

Примерно через месяц у самцов происходило разрастание семенников почти в 2 раза, у самок не были видны какие-либо внешние изменения. Разрастание семенников, по-видимому, не являлось болезненным или критичным, так как самцы продолжали обычную жизнь. Через месяц после инъекции клеток HeLa половине мышей давали вакцину в виде гомогената – пасты, нанесённой на ломти белого свежего хлеба, которую мыши довольно быстро поедали. Ещё через месяц

у мышей забирали кровь, изучали строение и изменения во внутренних органах.

При вскрытии оказалось, что внутренние органы инъецированных мышей претерпели изменения: были обнаружены увеличения яичек в семенниках, сферические образования в зонах лимфоузлов, опухоли на поверхности желудка и печени. Но самым стабильным показателем было изменение морфологии лёгких – разрастание лопастей долей лёгких наблюдали практически у всех мышей, как у самок, так и у самцов. Поэтому дальнейшее изучение действия клеток HeLa проводили на тканях лёгких у мышей.

На рисунке 3 представлены изменения в лёгких у мышей, подвергнутых инъекции клеток HeLa, при этом половина мышей была затем провакцинирована вакцинным материалом плодов томата с «ранним» белком онкосупрессором ВПЧ16 E2.

Как видно из рисунка 3, в контроле (вариант «Контроль») лёгкие у мышей имели почти одинаковое строение с двумя левыми долями с выемкой для помещения сердца и одной правой доли. У мышей, инъецированных

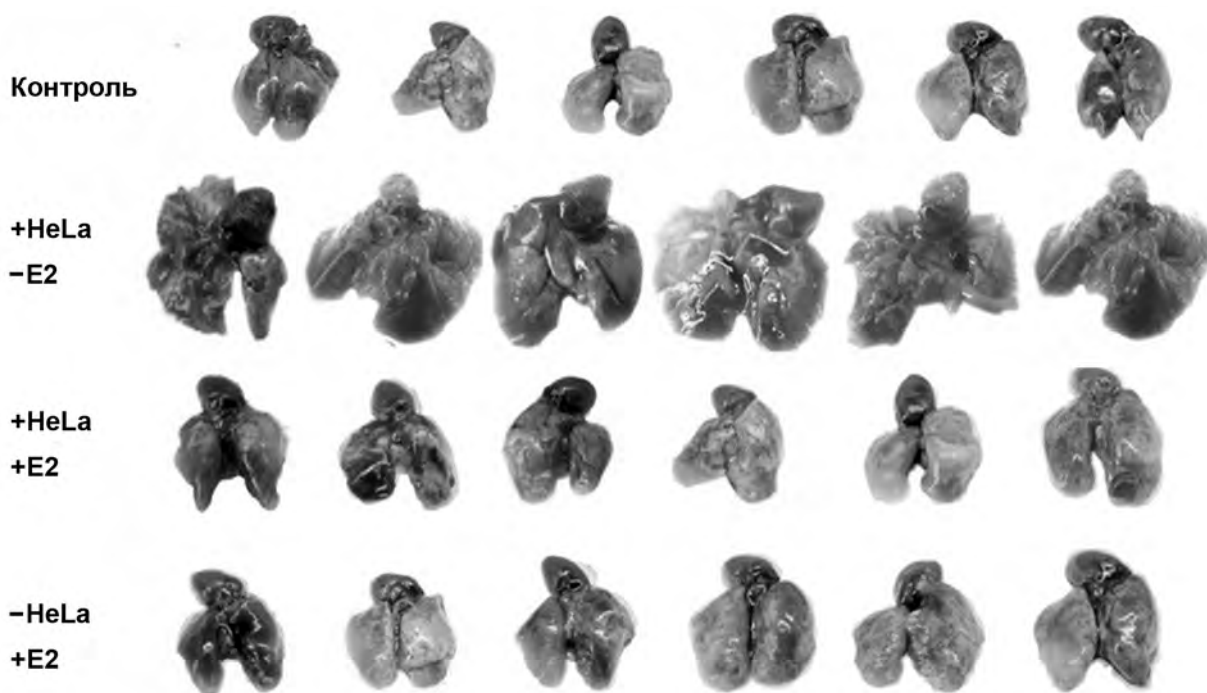


РИС. 3.

Влияние инъекции клеток HeLa на морфологию лёгких у мышей самцов и обращение изменений морфологии после перорального вакцинирования вакцинным материалом плодов томата с «ранним» белком ВПЧ16 E2: **Контроль** – лёгкие у мышей без обработок; вариант «**+HeLa –E2**» – лёгкие мышей через 2 месяца после инъекции клеток HeLa, но без вакцинирования с ВПЧ16 E2; вариант «**+HeLa + E2**» – лёгкие у мышей через 2 месяца после инъекции клеток HeLa и ещё через 2 месяца после двух вакцинирований с ВПЧ16 E2 с интервалом в 1 месяц; вариант «**–HeLa +E2**» – лёгкие у мышей, вакцинированных только ВПЧ16 E2. На рисунке лёгкие представлены вместе с сердцем, так как можно было манипулировать с лёгкими, только держа пинцетом за сердце

FIG. 3.

The effect of the injection of HeLa cells on the morphology of lungs of male mice and the regression of the changing of morphology after oral vaccination with vaccine material of tomato with "early" protein HPV16 E2; **Контроль** – mice lungs without treatment; variant "**+HeLa –E2**" – mice lungs after 2 months after the injection with HeLa cells and without vaccination with HPV16 E2; variant "**+HeLa +E2**" – mice lungs after 2 months after the injection with HeLa cells and then after 2 months of double vaccination with HPV16 E2 with the interval of 1 month; variant "**–HeLa +E2**" – lungs of mice only vaccinated with HPV16 E2. Lungs are presented together with hearts because it was easier to manipulate them by holding hearts with tweezers

клетками HeLa (вариант «+HeLa –E2»), наблюдали весьма существенное разрастание лёгких (в 1,8–2,3 раза; табл. 1, 2) и значительное изменение морфологии долей. После вакцинирования вакцинным материалом плодов трансгенного по ВПЧ16 E2 томата (вариант «+HeLa +E2») наблюдали регрессию опухолей, а также эффект возвращения размеров и нормальной морфологии долей лёгких. Одно вакцинирование вакцинным материалом плодов томата с ВПЧ16 E2 (вариант «–HeLa +E2») не оказывало заметного внешнего действия без инъекции клеток HeLa.

Изъятие лёгких и любое манипулирование с ними было достаточно затруднено, так как лёгкие повреждались при малейшем прикосновении и, более того, они приклеивались к любой поверхности, от которой их уже затем не было возможности отсоединить. Быстро высыхая, лёгкие становились плотными и твёрдыми с искажением нормальной морфологии. Поэтому после изолирования лёгкие сразу помещали в небольшое количество (1–2 мл) стерильного физраствора, осторожно расправляли лопасти в жидкости и фотографировали цифровым фотоаппаратом. Изображения переносили на бумагу

и по бумажным проекциям производили расчёт площади фронтальной поверхности, используя эти относительные величины для отражения размера (массы) лёгких.

Размер лёгких в контроле был одинаков у самцов и самок с небольшими отклонениями, так как мышей для работы отбирали ещё в период беременности самок, а после отобранные мышата дорастивались в одинаковых условиях содержания и кормления с целью устранения фоновых различий. Поэтому, очевидно, более значительное разрастание лёгких у самцов (табл. 1, 2) отражает их более высокую восприимчивость к раковым клеткам HeLa или наличием большего количества специфических рецепторов для этих клеток.

Согласно современным представлениям, в лёгких могут развиваться несколько типов рака: периферические эпителиальные округлые опухоли, пневмониеподобные обширные опухоли по лопастям долей, периферический рак Пенкаста по краю долей, различные центральные трахеально-бронхиальные опухоли. В экспериментальной работе по изучению действия раковых клеток HeLa на изолированные лёгкие были также об-

ТАБЛИЦА 1

ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ МАССОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОТОГРАФИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ ЛЁГКИХ У САМОК МЫШЕЙ В КОНТРОЛЕ, ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ КЛЕТОК HeLa (+HeLa –E2), И У МЫШЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ E2 ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ HeLa (+HeLa + E2) (ЦИФРАМИ ПРЕДСТАВЛЕНА МАССА ПРОЕКЦИЙ НА БУМАГЕ, В МГ)

Вариант	Мыши (самки), взятые в анализ											Среднее
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Контроль	25	21	20	21	22	23	0*	0*	0*	0*	0*	22 ± 2
+HeLa –E2	39	37	45	34	37	39	0*	0*	0*	0*	0*	39 ± 3
+HeLa +E2	23	21	22	26	27	26	24	23	21	23	27	24 ± 2

Примечание. * – лёгкие мышей сразу после выделения помещали в среду DMEM без взвешивания.

TABLE 1

RELATIVE MASS CHARACTERISTICS OF PHOTOGRAPHIC IMAGES OF LUNGS OF FEMALE MICE IN CONTROL, AFTER THE INJECTION OF CANCER HeLa CELLS (+HeLa –E2) AND IN MICE VACCINATED WITH E2 AFTER INJECTION OF HeLa CELLS (+HeLa +E2) (NUMBERS SHOW THE MASS OF PAPER PROJECTIONS IN MG)

ТАБЛИЦА 2

ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ВЕСОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОТОГРАФИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ ЛЁГКИХ У САМЦОВ МЫШЕЙ В КОНТРОЛЕ, У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ КЛЕТОК HeLa (+HeLa –E2), У МЫШЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ E2 ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ HeLa (+HeLa +E2) И У МЫШЕЙ, ТОЛЬКО ВАКЦИНИРОВАННЫХ E2 (–HeLa +E2) (ЦИФРАМИ ПРЕДСТАВЛЕНА МАССА ПРОЕКЦИЙ НА БУМАГЕ, В МГ)

Вариант	Мыши (самцы), взятые в анализ						Среднее
	1	2	3	4	5	6	
Контроль	22	23	26	17	19	24	22 ± 3
+HeLa –E2	46	48	47	60	52	49	50 ± 5
+HeLa +E2	26	25	23	21	26	33	26 ± 4
–HeLa +E2*	24	26	28	33	28	35	29 ± 4

Примечание. * – всего было проведено экспериментов с 26 самцами (вариант «–HeLa +E2»), в таблице приведены лишь частичные характерные результаты.

TABLE 2

RELATIVE WEIGHT CHARACTERISTICS OF PHOTOGRAPHIC IMAGES OF THE LUNGS IN MALE MICE IN CONTROL, IN MICE AFTER INJECTION OF HeLa CELLS (+HeLa –E2), IN MICE VACCINATED WITH E2 AFTER INJECTION OF HeLa (+HeLa +E2) AND IN MICE ONLY VACCINATED WITH E2 (–HeLa +E2) (NUMBERS SHOW THE MASS OF PAPER PROJECTIONS IN MG)

наружены внешне различные формы опухолевого роста в лёгких у мышей.

Для изучения индукции опухолеобразования, у нормальных мышей пинцетом изымали лёгкие, помещали в выросшую суспензию клеток HeLa и уже через 2 суток наблюдали развитие опухолей. На рисунке 4 можно видеть периферические округлые опухоли, возникшие через 2 суток после инокуляции изолированных лёгких в суспензии клеток HeLa (рис. 4а). Эти же лёгкие представлены в нижней части рисунка после окрашивания красителем азур-эозином по Романовскому [9, 10], который обычно используется для выявления раковых опухолей (рис. 4б). Помимо округлых опухолей на лопастях долей лёгких различимы обширные пневмониеподобные опухоли, интенсивно окрашиваемые азур-эозином по Романовскому (рис. 4б).

На рисунке 5 представлены различные типы опухолевого роста: пневмониеподобные опухоли (рис. 5а, б; увеличенный масштаб 1 : 10), опухоль по типу рака Пенкаста по верхнему краю доли лёгкого (рис. 5в), централизованные опухоли в зоне карины, то есть в основании трахеи при входе в бронхи (рис. 5г, д; окрашено азур-эозином по Романовскому), округлые и лопастные опухоли по тканям долей лёгких, окрашенных азур-эозином по Романовскому (рис. 5е, ж). Эти опухоли появились в изолированных лёгких мышей в течение 5 суток инокуляции с раковыми клетками HeLa.

Таким образом, при рассмотрении изолированных интактных лёгких, помещённых в суспензию раковых клеток HeLa, удалось выявить по меньшей мере 4 основных типа опухолевого роста с помощью окрашивания азур-эозином по Романовскому, которое использовалось для выявления скоплений ДНК раковых клеток: 1-й тип – периферические округлые эпителиальные опухоли, 2-й тип – центральные опухоли трахеальной карины, 3-й тип – периферические пневмониеподобные опухоли долей лёгких, 4-й тип – опухоли по верхнему краю лёгкого, сходному с раком Пенкаста. Наблюдалось также развитие структур, напоминающих раковые лимфатические узлы в тканях в виде мелких округлых скоплений на долях лёгких.

4. Гистологический анализ опухолей в окрашенных гематоксилином микротомных срезах

Окрашивание срезов замороженных опухолей красителем азур-эозином по Романовскому не позволяло детально изучить клеточные и тканевые паттерны опухолеобразования. Поэтому было решено опухолеобразующие лёгкие подвергнуть стандартной технике фиксации 96%-м этанолом и обезвоживающей проводки в ксилоле с целью заключения в парафин с последующим получением парафиновых срезов лёгких на микротоме.

Представлялось интересным изучить гистологию этих опухолевых тканей при микроскопировании микротомных срезов, окрашенных специфическим краси-

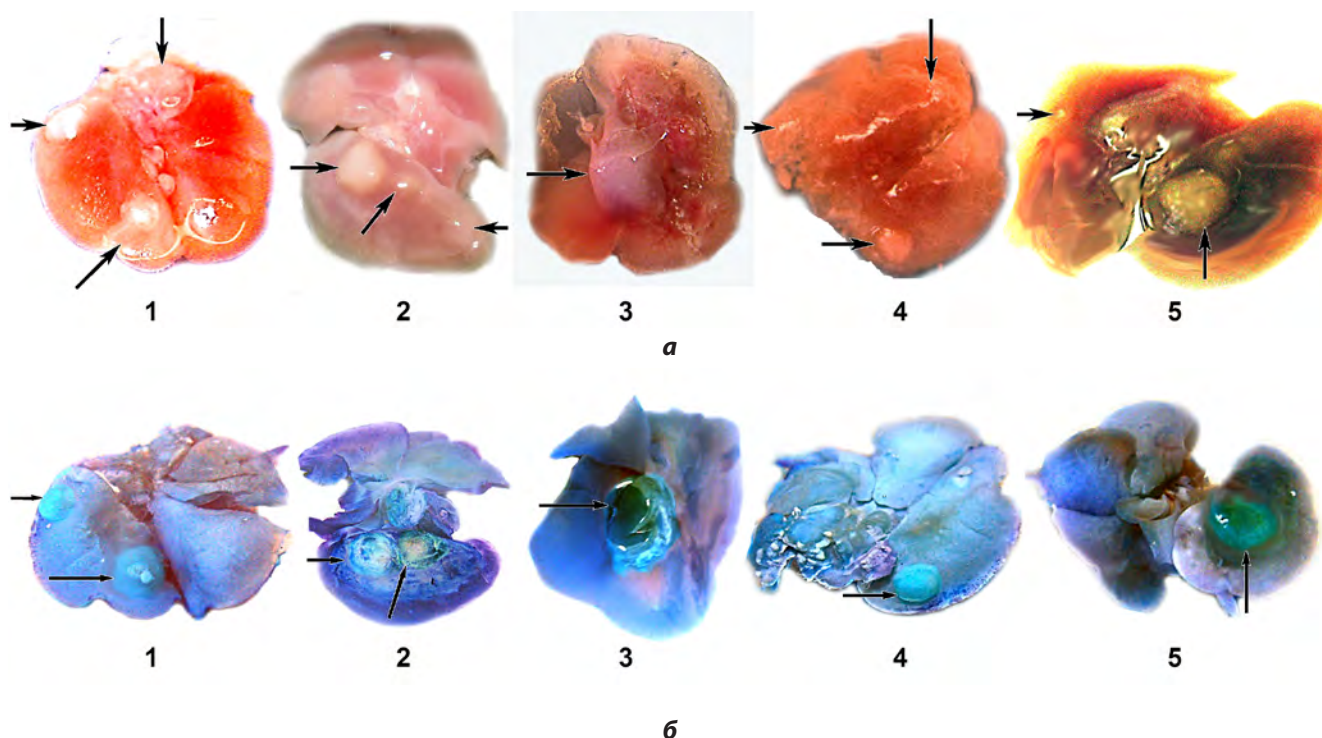


РИС. 4. Округлые периферические эпителиальные неокрашенные опухоли интактных лёгких у мышей после 2 суток культивирования с HeLa (а). Окраска азур-эозином по Романовскому (б) использована для выявления ДНК опухолей. Цифрами обозначены номера одних и тех же мышей, у которых были взяты лёгкие для анализа. Стрелками обозначены опухоли

FIG. 4. Round peripheral epithelial native (noncolored) tumours of intact mice lungs (a). Azur-eosin staining by Romanovsky was used for the detection of DNA of tumour growths (b). The numbers indicate the numbers of the same mice from which the lungs were taken for analysis. Arrows are pointed to tumour growths

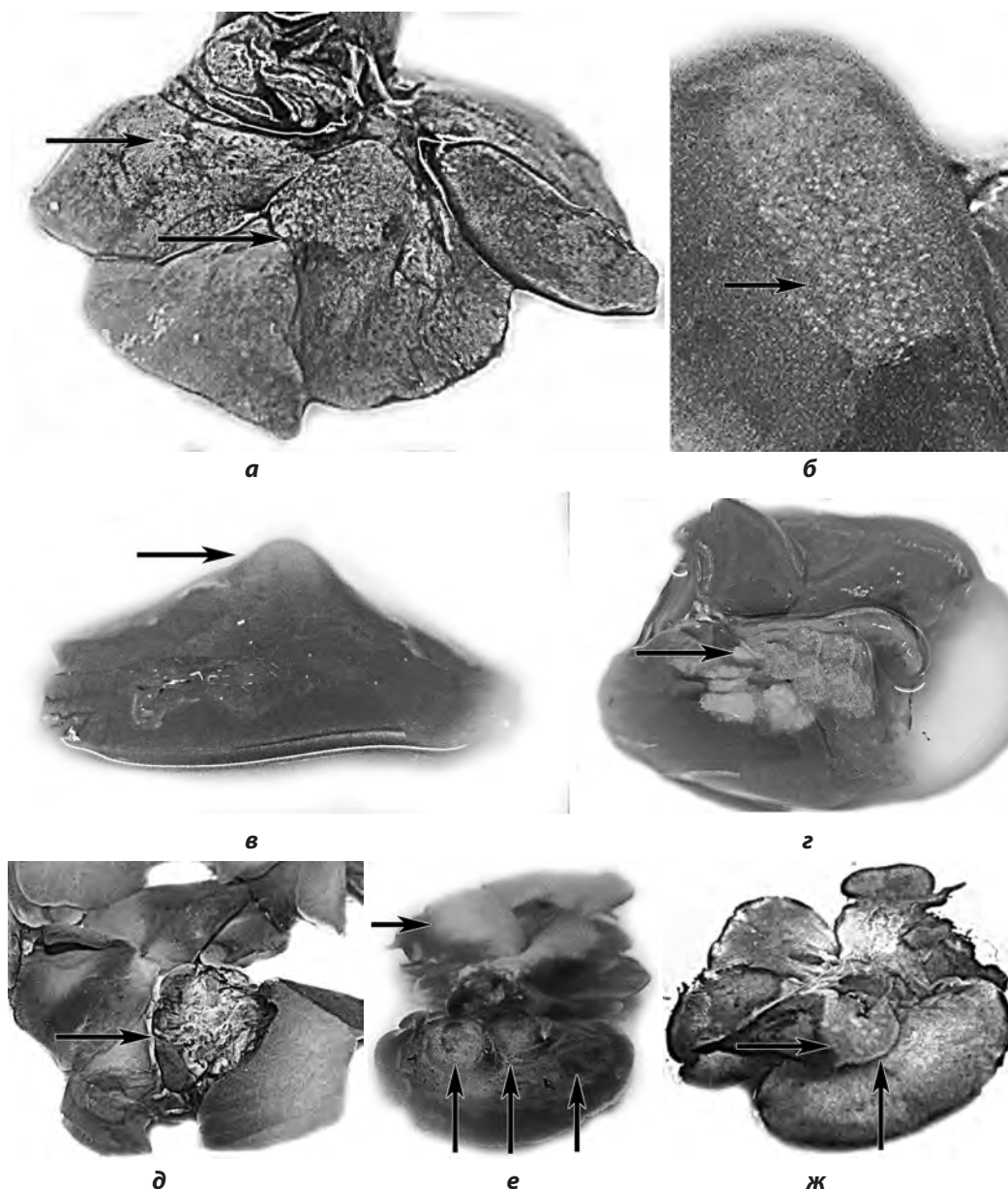


РИС. 5.

Типы опухолевого роста лёгких у мышей после инокуляции с раковыми клетками HeLa: **а** – пневмонииподобные опухоли; **б** – пневмонииподобная опухоль доли лёгкого (увеличение 1 : 10); **в** – периферическая опухоль по типу рака Пенкаста по верху доли лёгкого; **г** – централизованная опухоль в зоне карины при входе трахеи в бронхи; **д** – централизованная опухоль в области карины, окрашенная азур-эозином по Романовскому; **е, ж** – округлые и лопастные опухоли, окрашенные азур-эозином по Романовскому. Стрелками обозначены опухоли

FIG. 5.

Types of lung tumor growth in mice after inoculation with HeLa cancer cells: **а** – pneumonia-like tumors; **б** – pneumonia-like tumor of the lobe of the lung (magnification 1 : 10); **в** – peripheral tumor of the Pencast cancer type along the top of the lobe of the lung; **г** – centralized tumor in the carina zone at the entrance of the trachea to the bronchi; **д** – centralized tumor in areas of carina stained with azure-eosin according to Romanowsky; **е, ж** – rounded and lobed tumors stained with azure-eosin according to Romanowsky. Arrows indicate tumors

телем, гематоксилином по Carazzi, окрашивающим ядра пролиферирующих опухолевых клеток.

На рисунке 6 представлены паттерны микротомных срезов опухолеобразующих структур в присутствии клеток HeLa в лёгких у мышей после окраски гематоксилином по Carazzi, при этом лёгкие не были помещены в раствор вакцинного материала (вариант «+HeLa –E2»). При просмотре практически нескольких сотен срезов обнаружи-

вались протяжённости тканей и зоны делящихся клеток с ярко окрашенными гематоксилином ядрами (гиперхромные ядра). Большой частью эти зоны имели направление (вектор) в виде конусов нарастания, «волн» и обширных пространств тканевых разрастаний пролиферирующих клеток (рис. 6а–г). По типу опухолеобразования эти протяжённые зоны пролиферации круглых клеток с гиперхромными ядрами представляют собой аналог кру-

глоклеточной саркомы лёгких (рис. бд–ж), одного из наиболее агрессивных типов рака лёгких и мягких тканей дыхательной системы [11, 12]. По-видимому, пролиферация клеток и опухолеобразование захватывали все зоны лёгкого, то есть инвазия клеток HeLa в ткани лёгкого за 5 суток произошла достаточно быстро и, по всей вероятности, пролиферация была беспрепятственной и обширной, которая к тому же имела ярко выраженную направленность от центра лёгкого к периферическим областям.

На рисунке 7 представлены паттерны микротомных срезов лёгких мышей, инокуляция которых с клет-

ками HeLa происходила в присутствии вакцинного материала плодов томата, трансгенного по гену ВПЧ16 E2. Как показал просмотр нескольких сотен препаратов лёгких, окрашенных гематоксилином, не было выявлено зон или протяжённостей интенсивно пролиферирующих клеток с ярко окрашенными ядрами. Обычно паттерны на рисунке 7 представляли «полотна» крупных уплотнённых клеток периферической паренхимы лёгких (рис. 7а–в) со слабоокрашенными ядрами. На препаратах обнаружены протяжённости гладкомышечных клеток с бледно окрашенными ядрами миоцитов (рис. 7г)

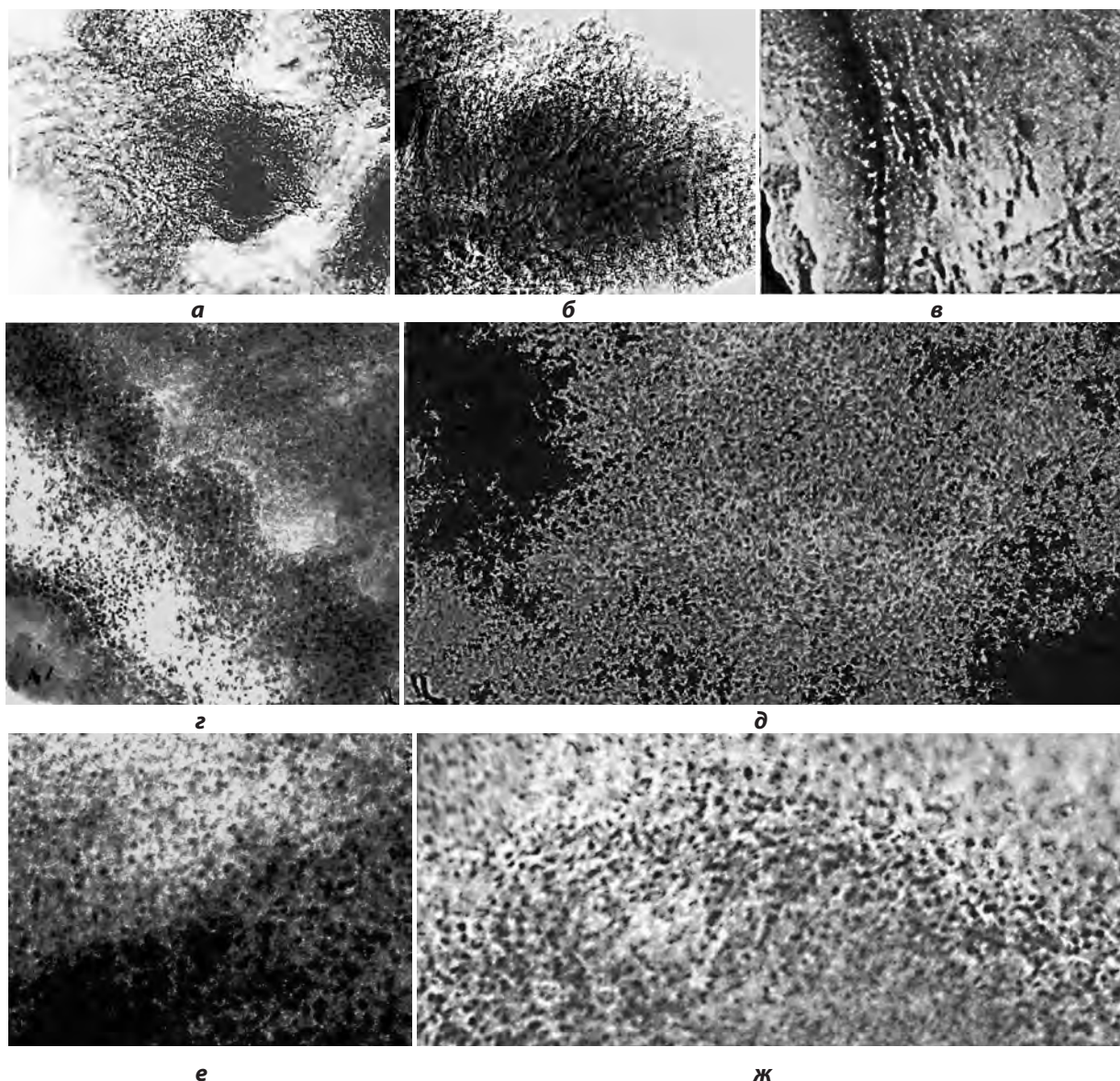


РИС. 6.

Паттерны микротомных срезов лёгких мышей через 5 суток инокуляции с раковыми клетками HeLa (вариант «+HeLa –E2») без вакцины. Срезы окрашены гематоксилином по Carazzi. Световой микроскоп, увеличение $\times 200$, разрешение видеокamеры Levenhuk: 2048–1536 пс. **а–г** – опухолевые «конусы» и «волны» нарастания зон пролиферации клеток с гиперхромными ядрами; **д–ж** – аналоги круглоклеточной саркомы лёгких мышей с гиперхромными ядрами

FIG. 6.

Patterns of microtome sections of mice lungs after 5 days of inoculation with HeLa cancer cells (variant «+HeLa –E2») without vaccine. Sections were stained with hematoxylin by Carazzi. Light microscope, magnification $\times 200$, Levenhuk video camera resolution: 2048–1536 pс. **a–g** – tumor “cones” and “waves” of growth of zones of proliferation of cells with hyperchromic nuclei; **d–h** – analogues of round cell sarcoma of the lungs of mice with hyperchromic nuclei

и поперечных срезов пучков миоцитов. На препаратах встречались структуры просветов бронхиол (рис. 7д, е) и, возможно, прослойки рыхлых клеток соединитель-

ных тканей лёгких с одиночными гиперхромными ядрами (рис. 7ж), но зон интенсивной пролиферации клеток не было обнаружено.

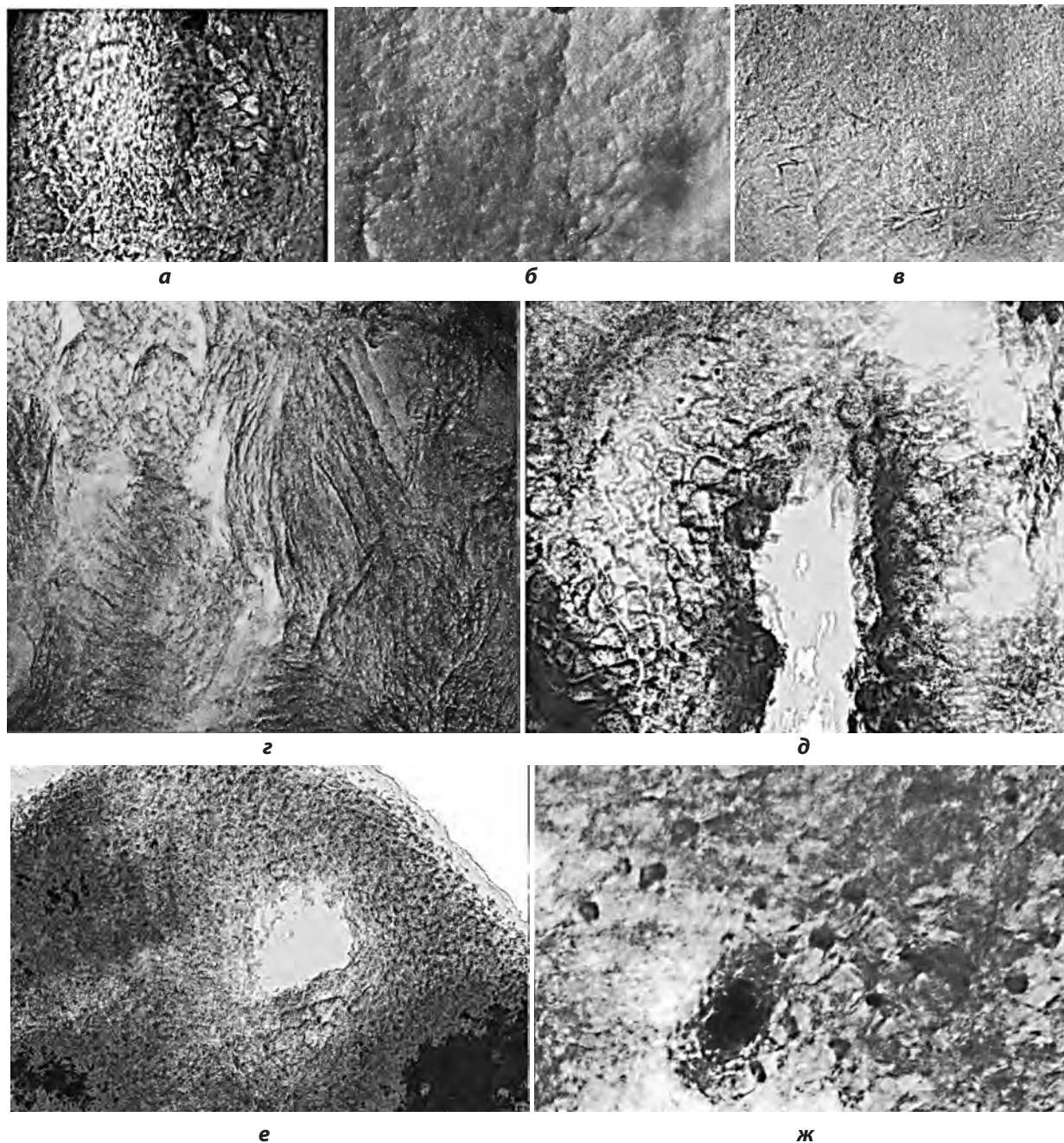


РИС. 7.

Паттерны микротомных срезов лёгких мышей через 5 суток инокуляции с раковыми клетками HeLa в присутствии вакцинного препарата плодов томата, трансгенного по ВПЧ16 E2 (вариант «+HeLa +E2»). Срезы окрашены гематоксилином по Carazzi. Световой микроскоп, увеличение $\times 200$, разрешение видеокамеры Levenhuk: 2048–1536 пс. **а–в** – паттерны уплотнённых клеток периферической паренхимы лёгких со слабоокрашенными ядрами; **з** – паттерны гладкомышечных длинных клеток и их поперечных срезов с бледно окрашенными ядрами; **д, е** – паттерны фрагментов бронхиол; **ж** – паттерн рыхлых клеток соединительнотканых прослоек с редкими гиперхромными ядрами

FIG. 7.

Patterns of microtome sections of mouse lungs after 5 days of inoculation with HeLa cancer cells in the presence of a vaccine preparation of tomato transgenic for HPV16 E2 (variant “+HeLa +E2”). Sections were stained with hematoxylin by Carazzi. Light microscope, magnification $\times 200$, Levenhuk video camera resolution: 2048–1536 pс. **a–v** – patterns of flattened cells of the peripheral lung parenchyma with weakly stained nuclei; **z** – patterns of long smooth muscle cells and their transverse sections with pale stained nuclei; **d, e** – patterns of fragments of bronchioles; **zh** – a pattern of loose cells of connective tissue layers with rare hyperchromic nuclei

Таким образом, раковые клетки HeLa вызывали весьма интенсивную пролиферацию клеток лёгких у мышей, приводящую к образованию опухолей. Если инокуляция происходила в присутствии вакцинного препарата плодов томата, трансгенного по ВПЧ16 Е2, то стимуляции пролиферации клеток лёгких не происходило. Эти результаты позволяют предполагать, что «ранний» белок ВПЧ16 Е2 мог бы послужить платформой для разработки вакцины против рака, вызываемого клетками HeLa, а также опосредованного высококанцерогенными типами папилломавирусов.

5. Изучение иммуногенности «раннего» белка ВПЧ16 Е2

Для испытания индукции иммуногенности, вызываемой «ранним» белком ВПЧ16 Е2, был использован имму-

ноферментный метод Элиспот, рекомендуемый для разработок по созданию вакцин как обязательный способ проверки клеточного иммунного ответа.

Периферическую кровь и селезёнку выделяли из мышей, очищали от эритроцитов с помощью флотации при 700 g в рефрижераторной центрифуге и получали очищенные препараты лимфоцитов в супернатанте. Очищенные образцы лимфоцитов подвергали инокуляции и выращиванию на среде DMEM на мембранных дисках в присутствии вакцинного материала плодов томата, трансгенного по гену ВПЧ16 Е2 в качестве активатора генераций иммунных клеток. Наличие Т-лимфоцитов в периферических мононуклеарных клетках крови и в спленоцитах контролировали в световом микроскопе по их характерному виду [8] с помощью видеокамеры Levenhuk.

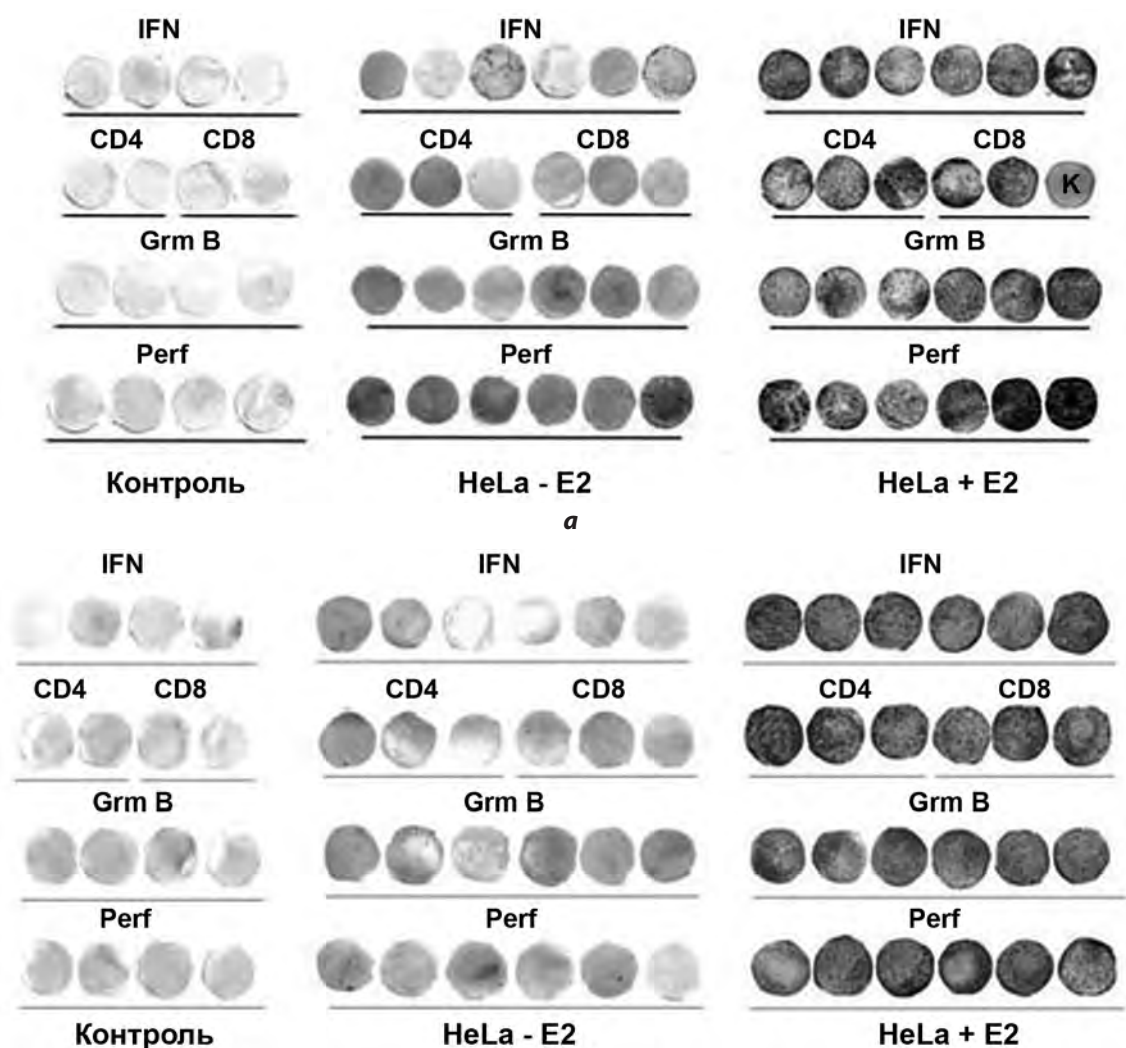


РИС. 8.

Элиспот, показывающий активацию синтеза γ -интерферона (INF), CD4- и CD8-T-лимфоцитов, ферментов апоптоза: гранзима В (GrmB), перфорины (Perf) в периферических мононуклеарных клетках крови (а) и спленоцитах мышей (б), предварительно инъецированных клетками HeLa и затем вакцинированных с ВПЧ16 Е2: К – контроль [8]

FIG. 8.

Elispot showing activation of synthesis of γ -interferon (INF), CD4- and CD8-T-lymphocytes, apoptosis enzymes: granzyme B (GrmB), perforin (Perf) in peripheral blood mononuclear cells (a) and mouse splenocytes (b), preliminarily injected with HeLa cells and then vaccinated with HPV16 E2: K – control [8]

Как видно из рисунков 8 и 9, присутствие вакцинного препарата из плодов томата, трансгенного по ВПЧ16 E2, в питательном растворе при выращивании иммунных клеток приводило к весьма значительной активации Т-клеточного иммунного ответа: значительно усиливался синтез γ -интерферона, увеличивалось содержание CD4-T-

лимфоцитов (хелперов) и CD8-T-лимфоцитов (киллеров) [8], происходило увеличение количества Т-клеточных рецепторов, а также резко возрастала активность ферментов апоптоза: гранзима В, перфорина и гранулизина.

Таким образом, вакцинирование вакцинным материалом плодов томата, трансгенного по гену ВПЧ16 E2,

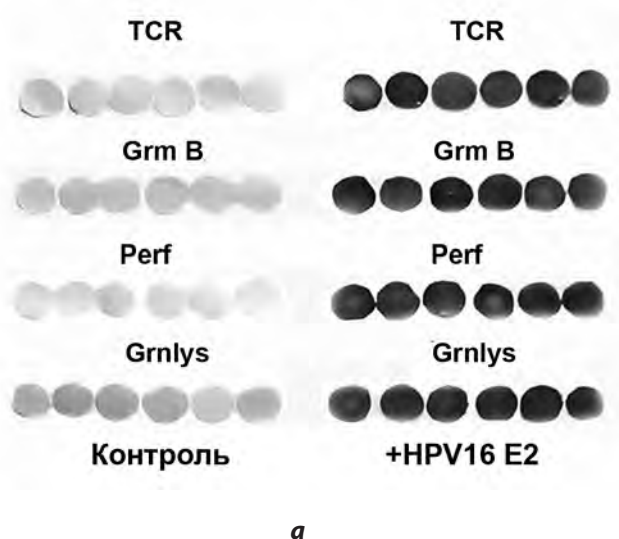


РИС. 9. Элispот, показывающий активацию Т-клеточного рецептора (TCR), ферментов апоптоза: гранзима В (GrmB), перфорина (Perf), гранулизина (Grnlys) в периферических мононуклеарных клетках крови (а) и в спленоцитах (б) мышей, предварительно инъецированных клетками HeLa и затем вакцинированных E2. **Контроль** – мыши, инъецированные клетками HeLa без вакцинирования; **К** – пустой мембранный диск без нанесения препарата спленоцитов

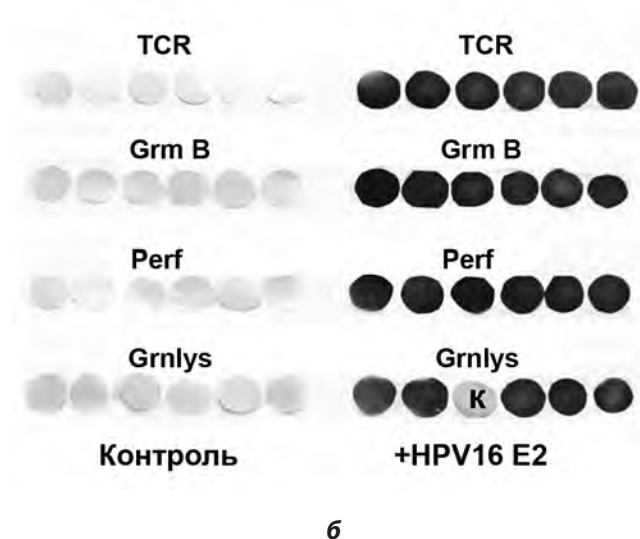


FIG. 9. Elispot showing activation of T-cell receptor (TCR), apoptosis enzymes: granzyme B (GrmB), perforin (Perf), granulysin (Grnlys) in peripheral blood mononuclear cells (a) and in splenocytes (b) of mice pre-injected with HeLa cells and then vaccinated with E2. **Контроль** – mice injected with HeLa cells without vaccination; **К** – an empty membrane disk without applying the splenocyte preparation

ТАБЛИЦА 3
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВПЧ16 E2 НА СОДЕРЖАНИЕ γ -ИНТЕРФЕРОНА, КОЛИЧЕСТВО CD4- И CD8-T-ЛИМФОЦИТОВ, ГРАНЗИМА В И ПЕРФОРИНА В КРОВИ И СЕЛЕЗЁНКЕ МЫШЕЙ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ВНУТРИМЫШЕЧНО ИНЪЕЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАМИ HeLa

Вариант	γ -интерферон	CD4	CD8	Гранзим В	Перфорин
Периферические мононуклеарные клетки крови					
Контроль	5, 20, 17, 14	8, 9, 0	5, 4, 0	6, 7, 10, 7	0, 2, 5, 14
+HeLa –E2	6, 10, 22, 3, 0, 51	7, 8, 4	12, 4, 14	8, 2, 8, 17, 9, 5	41, 6, 4, 7, 5, 8
+HeLa +E2	420, 840, 584, 512, 576, 460	615, 1232, 615	646, 1104	688, 924, 672, 840, 749, 720	760, 666, 1007, 552, 491, 354
Спленоциты					
Контроль	0, 6, 12, 0	1, 5	7, 0	6, 0, 0, 0	0, 6, 6, 0
+HeLa –E2	9, 7, 0, 14, 43, 53	57, 25, 16	9, 21, 7	14, 44, 36, 28, 0, 5	30, 15, 10, 11, 14, 11
+HeLa +E2	448, 568, 664, 280, 680, 572	600, 642, 595	511, 504, 336	570, 384, 540, 590, 564, 264	435, 485, 528, 618, 612, 552

Примечание. Количество клеток показано в пересчёте на мембранный нитроцеллюлозный фильтр; числа приведены по индивидуальным мышам: 1 число = 1 мышь.

TABLE 3
THE THERAPEUTIC EFFECT OF HPV16 E2 ON THE CONTENT OF γ -INTERFERON, THE NUMBER OF CD4- AND CD8-T-LYMPHOCYTES, GRANZYME B AND PERFORIN IN THE BLOOD AND SPLEEN OF MICE PREVIOUSLY INTRAMUSCULARLY INJECTED WITH HeLa CELLS

ТАБЛИЦА 4

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВПЧ16 Е2 НА СОДЕРЖАНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА, ГРАНЗИМА В, ПЕРФОРИНА И ГРАНУЛИЗИНА В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ И В СПЛЕНОЦИТАХ МЫШЕЙ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ВНУТРИМЫШЕЧНО ИНЪЕЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАМИ HeLa

TABLE 4

THERAPEUTIC EFFECT OF HPV16 E2 ON THE CONTENT OF THE T-CELL RECEPTOR, GRANZYME B, PERFORIN AND GRANULISIN IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AND SPLENOCYTES OF MICE PREVIOUSLY INTRAMUSCULARLY INJECTED WITH HeLa CELLS

Вариант	Т-клеточный рецептор	Гранзим В	Перфорин	Гранулизин
Периферические мононуклеарные клетки крови				
+HeLa –E2	31, 20, 14, 27, 16, 23	33, 41, 15, 25, 37, 39	44, 30, 9, 23, 25, 27	15, 19, 13, 20, 22, 25
+HeLa +E2	1224, 2512, 4688, 1892, 2800, 2312	1084, 1691, 4466, 4912, 5104, 6945	3532, 4280, 5120, 5216, 3248, 4096	5364, 4688, 4480, 4234, 5016, 4896
Спленициты				
+HeLa –E2	32, 40, 24, 10, 26, 9	40, 74, 59, 39, 45, 53	18, 15, 32, 20, 25, 26	18, 15, 13, 12, 19, 13
+HeLa +E2	824, 1165, 864, 964, 896, 1176	1008, 1104, 634, 952, 1004, 1126	1480, 1304, 1392, 1384, 1064, 1392	1648, 1220, 992, 1360, 1088

Примечание. Количество клеток показано в пересчёте на мембранный нитроцеллюлозный фильтр; числа приведены по индивидуальным мышам: 1 число = 1 мышь.

вызывало весьма значительный иммунный клеточный ответ. В таблицах 3, 4 представлены результаты подсчёта «пятен», клонов Т-лимфоцитов, активированных индуктором ВПЧ16 Е2, и регистрируемых по реакции с соответствующими первичными и вторичными антителами и красящим субстратом с сопряжённым окислителем BCIP/NBT.

Исходя из результатов, изложенных в таблицах 3, 4, можно предполагать, что использование вакцинного материала на основе антигенного белка ВПЧ16 Е2 может быть перспективно для создания пероральной терапевтической вакцины против рака шейки матки и, возможно, против других опасных аногенитальных папилломатозов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была впервые создана и использована экспериментальная модель мышей, подвергнутых воздействию раковых клеток HeLa, которые вызывают разнообразные варианты опухолевого роста в лёгких, семенниках, брюшной полости и т. д.

«Ранние» белки папилломавируса высококанцерогенного типа ВПЧ16 представляют большой интерес для разработки терапевтических вакцин против рака, и особенно широко в мировой практике проводятся исследования по изучению действия антител к «ранним» белкам на развитие уже имеющихся опухолей, предполагая, что основной онкобелок ВПЧ16 Е7 представляет собой таргетный белок при создании терапевтической вакцины. Действительно, онкобелок ВПЧ16 Е7 имеет небольшие размеры, 98 аминокислотных остатков. Но при этом в его небольшой последовательности обнаружены 42–47 линейных эпитопа, что, возможно, объясняет его высокие антигенные свойства: стабиль-

ность, высокий титр антител, высокая степень авидности (от англ. avidity – жадность, алчность) и быстрота связывания с антигенным белком ВПЧ16 Е7, перекрёстное взаимодействие с антигенным белком ВПЧ16 Е6 и другие свойства. Тем не менее, несмотря на высокий АГ-специфический иммунный ответ, ни сам белок Е7 при действии на клетки HeLa, ни антитела к нему не проявили каких-либо антиканцерогенных свойств. Возможно, что препятствием является барьер белковых ингибиторов контрольных точек иммунитета: связывание рецепторных белков PD-1 активированных лимфоцитов с рецептором PD-L1 раковой клетки. Сходным образом, белки оболочки ВПЧ16 L1 активируют Т-клеточный ответ, но не действуют на раковые опухоли, возможно, по той же причине невозможности преодоления барьера ингибиторов PD-1 – PD-L1 контрольных точек иммунитета. Интересным является и тот факт, что при вакцинации мышей дозой в 500 мкг ВПЧ16 Е7 и продолжительном дальнейшем содержании (3 месяца), не было обнаружено спонтанного развития опухолей у вакцинированных мышей.

«Ранний» белок ВПЧ16 Е2 также привлекал внимание исследователей. В частности, M. Dreer et al. [13], получили интересные результаты, изучая структуру и активность белка Е2. Они установили, что этот белок является сильным репрессором транскрипции с промоторов белков онкогенов ВПЧ16 Е6 и ВПЧ16 Е7. По их данным, структура белка Е2 включает два домена: трансактивационный N-домен и С-домен связывания с ДНК. Внутри белка Е2 со стороны N-домена ближе к зоне перешейки расположен «внутренний» ген белка Е8, а вся эта зона обозначается как Е2С-домен. Авторами установлено [14], что Е2С-домен белков Е8/Е2 связан с общим комплексом ядерного репрессора в клетках хозяина. Дисрегуляция этого репрессорного комплекса приводит к различным типам канцероген-

неза [15]. Было также изучено и терапевтическое действие рекомбинантного MVA E2 белка папилломавируса в клинических испытаниях [16]. Оно продемонстрировало на 1172 женщинах и 180 мужчинах то, что вектор, содержащий рекомбинантный белок MVA E2 папилломавируса, введённый путём инъекции, устранял интраэпителиальные и аногенитальные нарушения в течение двух лет.

Нами впервые было показано, что противоопухолевый эффект действия «раннего» белка ВПЧ16 E2 коррелирует с активацией Т-клеточного иммунитета, при этом весьма значительно усиливается синтез γ -интерферона, увеличивается содержание Т-клеточного рецептора, возрастает количество CD4- (хелперов) и CD8- (киллеров) Т-лимфоцитов, при этом их соотношение соответствует 1, то есть нормальному развитию иммунитета, а также регрессия опухолей сопровождается активацией (синтезом) ферментов апоптоза: гранзима В, перфорина и гранулизына. Также это коррелирует с обнаруженным нами впервые фактом, что ВПЧ16 E2 моментально «убивает» раковые клетки HeLa.

В разработанной нами экспериментальной модели опухолеобразования в лёгких мышей обращают на себя два аспекта. Первый заключается в обнаруженном довольно быстром преобразовании нормальных дифференцированных клеток лёгких в мелкоклеточные (круглоклеточные) опухоли с гиперхромными ядрами. Высокая восприимчивость тканей лёгких к инвазии раковых клеток HeLa может быть результатом наличия специфического рецептора, способствующего раковой трансформации и быстрому переходу дифференцированных клеток к пролиферации. Известны множественные мутации в лёгких, свидетельствующие об опухолевом росте лёгких, например, мутация T790 в гене, кодирующем EGFR (рецептор эпидермального ростового фактора), которую рассматривают как маркер канцерогенеза лёгких [17] и др. С другой стороны, также тканям лёгких приписывают избирательное накопление Т-клеточного регулятора, класса Т-лимфоцитов, входящих в микроокружение опухолей и стабилизирующих их [18].

Второй аспект заключается в более сильном опухолеобразовании лёгких у мышей самцов по сравнению с самками. Помимо общих рецепторов к клеткам HeLa в радиальной части головки сперматозоидов у самцов присутствует специфический рецептор: белок синдекан-1 для белка оболочки ВПЧ16 L1, что, по всей вероятности, способствует связыванию вируса и его более длительному нахождению в генитальных тканях самцов и более широкому распространению по органам инфицированного хозяина [19].

Исходя из результатов, изложенных в тексте, представленных на рисунках и в таблицах, можно предполагать, что использование вакцинного материала плодов трансгенного томата на основе антигенного белка ВПЧ16 E2 перспективно для разработки и создания терапевтической вакцины против рака лёгких, рака шейки матки и, возможно, против других типов рака и аногенитальных папилломатозов.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022; 72(1): 7-33. doi: 10.3322/caac.21708
2. McBride AA. Human papillomaviruses: Diversity, infection and host interaction. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20(2): 95-108. doi: 10.1038/S41579-021-00617-5
3. Blakaj DM, Fernandez-Feuntes N, Chen Z, Hegde R, Fiser A, Bark RD, et al. Evolutionary and biophysical relationships among the papillomavirus E2 proteins. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009; 14(3): 900-917. doi: 10.2741/3285
4. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С. Антипролиферативное действие «раннего» белка папилломавируса ВПЧ16 E2 на опухоли семенников мышей, индуцированные клетками HeLa. *Доклады Академии наук.* 2019; 488(1): 103-107. doi: 10.31857/S0869-56524881103-107
5. Богданов Л.А., Шишков Д.К., Кутихин А.Г. Сравнение различных видов прогрессивных гематоксилинов при окрашивании элементов системы кровообращения и гепатолиенальной системы. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019; 39(6): 46-54. doi: 10.15372/SSMJ20190606
6. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С. Синтез белков E2, E6 и E7 «ранних» генов папилломавируса тип 16 в растительной экспрессионной системе. *Доклады Академии наук.* 2018; 482(5): 601-604. doi: 10.31857/S086956520003034-0
7. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. Исследование иммуногенности антигенного белка высокоонкогенного вируса папилломы человека HPV16 L1, полученного в растительной экспрессионной системе на основе трансгенного томата. *Доклады Академии наук.* 2017; 474(2): 251-254. doi: 10.7868/S0869565217140249
8. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С. Индукция синтеза интерферона, CD4 и CD8 Т-лимфоцитов в крови и селезёнке мышей, перорально вакцинированных «ранним белком» ВПЧ16 E2. *Доклады Академии наук.* 2019; 488(3): 333-337. doi: 10.31857/S0869-56524883333-337
9. Marshall PN, Bentley SA, Lewis SM. Staining properties and stability of a standardized Romanowsky stain. *J Clin Pathol.* 1978; 31(3): 280-282. doi: 10.1136/jcp.31.3.280
10. Засухин Д.Н. Романовский Д.Л. (80 лет метода окраски крови и паразитов крови). *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 1971; 40(6): 729.
11. Ungari M, Manotti L, Tanzi G, Varotti E, Ferrero G, Gusolfino MD, et al. NeuN, a DNA binding neuron-specific protein expressed by Merkel cell carcinoma: Analysis of 15 cases. *Pathologica.* 2021; 113(6): 421-426. doi: 10.32074/1591-951x-195
12. Zhu J, Li B, Hu J.J., Liu W, Lu D, Liu J. Undifferentiated small round cell sarcoma of the hypopharynx: A rare case report and review of the literature. *Onco Target Ther.* 2021; 14: 4537-4544. doi: 10.2147/OTT.S320335
13. Dreer M, Fertey J, Poel van de S, Straub E, Madlung J, Macek B, et al. Interaction of NCOR/SMRT repressor complexes with papillomavirus E8^ΔE2C proteins inhibits viral replication. *PLoS Pathog.* 2016; 12(4): e1005556. doi: 10.1371/journal.ppat.1005556

14. Dreer M, van de Poel S, Stubenrauch F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein. *Virus Res.* 2017; 231: 96-102. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.005

15. Wong M.M, Guo C, Zhang J. Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: Mechanism, function and regulation. *Am J Clin Exp Urol.* 2014; 2(3): 169-187.

16. Rosales R, Lopez-Countreiras M, Rosales C, Magallanes-Molina J-R, Gonzalez-Vergara R, Arroyo-Cazarez JM, et al. Regression of human papilloma virus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine. *Hum Gene Ther.* 2014; 25(12): 1035-1049. doi: 10.1089/hum.2014.024

17. Wang Y, Wei Y, Ma X, Ma X, Gong P. Association between advanced NSCLCT790MEGFR-TKI secondary resistance and prognosis: An observational study. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(28): e11346. doi: 10.1097/MD.00000000000011346

18. Wang L, Zhang Y, Xie F. T regulatory cell/T helper 17 cell imbalance functions as prognostic biomarker of oral squamous cell carcinoma – CONSORT. *Medicine (Baltimore).* 2020; 99(49): e23145. doi: 10.1097/MD.00000000000023145

19. Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS ONE.* 2011; 6(3): e15036. doi: 10.1371/journal.pone.0015036

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022; 72(1): 7-33. doi: 10.3322/caac.21708

2. McBride AA. Human papillomaviruses: Diversity, infection and host interaction. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20(2): 95-108. doi: 10.1038/S41579-021-00617-5

3. Blakaj DM, Fernandez-Feuntes N, Chen Z, Hegde R, Fiser A, Bark RD, et al. Evolutionary and biophysical relationships among the papillomavirus E2 proteins. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009; 14(3): 900-917. doi: 10.2741/3285

4. Salyaev RK, Rekoslavskaya NI, Stolbikov AS. The antiproliferative effect of the “early” protein E2 of papillomavirus HPV16 on testis tumors of mice induced by the injection of HeLa cells. *Doklady Akademii nauk.* 2019; 488(1): 296-299. (In Russ.). doi: 10.1134/S1607672919050028

5. Bogdanov LA, Schischkov DK, Kutichin AG. The comparison of different types of progressive gematoxylin during staining of elements of blood circulatory system and hepatolienal system. *The Siberian Scientific Medical Journal.* 2019; 39(6): 46-54. (In Russ.). doi: 10.15372/SSMJ20190606

6. Salyaev RK, Rekoslavskaya NI, Stolbikov AS. Synthesis of proteins encoded by the “early” genes E2, E6 and E7 of papillomavirus of type 16 in the plant expression system. *Doklady Akademii nauk.* 2019; 488(2): 316-319. (In Russ.). doi: 10.1134/S1607672918050113

7. Salyaev RK, Rekoslavskaya NI, Stolbikov AS, Tretyakova AV. The study of immunogenicity of the antigenic protein of high risk oncogenic type of the human papillomavirus HPV16 L1 produced in the plant expression system on the base of transgenic tomato. *Doklady Akademii nauk.* 2017; 474(2): 2251-254. (In Russ.). doi: 10.1134/S1607672917030140

8. Salayev RK, Rekoslavskaya NI, Stolbikov AS. The induction of the synthesis of interferon, CD4 and CD8 T-lymphocyte in blood and spleen of mice after oral vaccination with the “early” protein HPV16 E2. *Doklady Akademii nauk.* 2018; 482(2): 271-274. (In Russ.). doi: 10.1134/S1607672918050113

9. Marshall PN, Bentley SA, Lewis SM. Staining properties and stability of a standardized Romanowsky stain. *J Clin Pathol.* 1978; 31(3): 280-282. doi: 10.1136/jcp.31.3.280

10. Zasuchin DN. Romanowsky D.L. (80 years of the methods of blood staining and parasites of blood). *Medical parasitology and parasitic diseases.* 1971; 40(6): 729. (In Russ.).

11. Ungari M, Manotti L, Tanzi G, Varotti E, Ferrero G, Gusolfino MD, et al. NeuN, a DNA binding neuron-specific protein expressed by Merkel cell carcinoma: Analysis of 15 cases. *Pathologica.* 2021; 113(6): 421-426. doi: 10.32074/1591-951x-195

12. Zhu J, Li B, Hu JJ, Liu W, Lu D, Liu J. Undifferentiated small round cell sarcoma of the hypopharynx: A rare case report and review of the literature. *Onco Target Ther.* 2021; 14: 4537-4544. doi: 10.2147/OTT.S320335

13. Dreer M, Fertey J, Poel van de S, Straub E, Madlung J, Macek B, et al. Interaction of NCOR/SMRT repressor complexes with papillomavirus E8^{E2C} proteins inhibits viral replication. *PLoS Pathog.* 2016; 12(4): e1005556. doi: 10.1371/journal.ppat.1005556

14. Dreer M, van de Poel S, Stubenrauch F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein. *Virus Res.* 2017; 231: 96-102. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.005

15. Wong M.M, Guo C, Zhang J. Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: Mechanism, function and regulation. *Am J Clin Exp Urol.* 2014; 2(3): 169-187.

16. Rosales R, Lopez-Countreiras M, Rosales C, Magallanes-Molina J-R, Gonzalez-Vergara R, Arroyo-Cazarez JM, et al. Regression of human papilloma virus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine. *Hum Gene Ther.* 2014; 25(12): 1035-1049. doi: 10.1089/hum.2014.024

17. Wang Y, Wei Y, Ma X, Ma X, Gong P. Association between advanced NSCLCT790MEGFR-TKI secondary resistance and prognosis: An observational study. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(28): e11346. doi: 10.1097/MD.00000000000011346

18. Wang L, Zhang Y, Xie F. T regulatory cell/T helper 17 cell imbalance functions as prognostic biomarker of oral squamous cell carcinoma – CONSORT. *Medicine (Baltimore).* 2020; 99(49): e23145. doi: 10.1097/MD.00000000000023145

19. Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, Menegazzo M, Francavilla F, Barzon L, et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS ONE.* 2011; 6(3): e15036. doi: 10.1371/journal.pone.0015036

Сведения об авторах

Салеев Юрий Константинович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, советник РАН, главный научный сотрудник лаборатории физиологии растительной клетки, ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, <https://orcid.org/0000-0002-7602-7301>

Рекославская Наталья Игоревна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории физиологии растительной клетки, ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3480-9855>

Information about the authors

Ryurik K. Salyaev – Dr. Sc. (Biol.), Professor, Corresponding Member of RAS, Advisor of RAS, Chief Research Officer at the Laboratory of Physiology of Plant Cell, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of RAS, <https://orcid.org/0000-0002-7602-7301>

Natalya I. Rekoslavskaya – Dr. Sc. (Biol.), Chief Research Officer of the Laboratory of Physiology of Plant Cell, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of SB RAS, e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3480-9855>

Статья опубликована в рамках Второй Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания».