

Figová K.¹, Hraběta J.¹, Sobotková E.², Dušková M.², Vonka V.², Eckschlager T.¹

1) *Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol, Praha,*

2) *ÚHKT, Praha*

Jednou z foriem génovej liečby nádorov sú onkolytické vírusy – vírusy, ktoré sa selektívne replikujú v nádorových bunkách a tým ich likvidujú. Za ostatných 20 rokov výskumu bolo identifikovaných viacero vírusov s onkolytickou aktivitou. Niektoré prirodzene sa vyskytujúce vírusy, napr. vírus vezikulárnej somatitídy, herpes simplex vírus, Newcastle disease virus a reovírus prednostne infikujú a usmrcujú transformované bunky (Norman and Lee, 2000; Stojdl et al., 2000; Sinkovics and Horvath, 2000; Farassati et al., 2001). Atenuovaný kmeň vírusu osýpiek Edmonston-B pôvodne pripravený pre použitie ako živá vírusová vakcína, má potenciálne onkolytické využitie (Grote et al., 2001). Špecifické génové modifikácie na adenovírusoch, influenza vírusoch a herpes vírusoch pomohli do týchto vírusov vniesť selektívnu onkolytickú aktivitu a znížiť alebo úplne eliminovať ich patogenitu (Martuza, 2000; Bergmann et al., 2001; Dobbelstein, 2004). Výsledky narastajúceho počtu štúdií s takto pripravenými vírusmi dokazujú, že môžu nielen efektívne a selektívne ničiť transformované bunkové línie, ale taktiež nesú protitumorové vlastnosti *in vivo*.

Reovírus serotypu 3, Dearing, bol prvýkrát izolovaný z intestinálneho traktu zdravých osôb. V nádorovej bunke pre svoju replikáciu využíva aktivovanú Ras signálnu dráhu (alebo jej časti). V nenádorových bunkách sa nereplikuje, a preto nevyvoláva žiad-

ne manifestné ochorenie. V skutočnosti sa väčšina ľudí dostane do kontaktu s reovírusom už do svojich piatich rokov s malými či žiadnymi prejavmi infekcie. Aktivácia Ras onkogénu vedie k inaktivácii bunkových antivírusových mechanizmov tak, že špecificky odstraňuje translačný blok pre vznik reovirálnych transkriptov.

Základný mechanizmus zabránenia iniciácie translácie ako odpoveď bunky na infekciu vírusom alebo environmentálny stres v hostiteľskej bunke zahŕňa fosforyláciu alfa podjednotky eukaryotického iniciačného faktora-2 (eIF-2) proteínkinázou PKR (na dvojvláknovej RNA závislá proteínkináza) (Wek, 1994; de Haro et al., 1996; Brostrom and Brostrom, 1998). PKR je prítomná v nízkej koncentrácii v každej bunke. Odpoveďou na IFN vylučovaný bunkami napadnutými vírusom je jej zvýšená expresia. Naviazanie virálnej dvojvláknovej RNA na PKR spôsobí jej dimerizáciu a následnú aktiváciu autofosforyláciou. Fosforylácia eIF-2 aktivovanou PKR znemožní vznik väzby GTP na eIF-2, čím sa zabráni začleneniu Met-t-RNA a vzniku 43S iniciačného komplexu. V bunkách s aktivovaným Ras onkogénom k zastaveniu replikácie nedochádza, pretože v týchto bunkách nenastane aktivácia PKR.

V našej štúdiu sme *in vitro* sledovali účinok reovírusu na myšiaciu bunkovú líniu (TC-1) transformovanú ľudským papiloma vírusom typu 16 (HPV 16) a aktivovaným H-ras onkogénom – model vírusom indukovaného nádoru s aktiváciou onkogénom H-ras. Ako kontrolu sme použili normálne ľudské fibroblasty. Efekt vírusu na bunky sme hodnotili MTT testom a mikrokinematografiou. S touto bunkovou líniou transplantovanou syngenným myšiam sme robili i prvé testy *in vivo*.

In vitro sme preukázali vysokú účinnosť reovírusu na bunky TC-1, avšak nie na normálne ľudské fibroblasty.

Narastené nádory sme liečili reovírusom a porovnávali účinnosť rôznych protokolov podávania vírusu. Podanie reovírusu spomalilo rast nádoru, ale nevedlo k jeho úplnému vyliečeniu. Najúčinnějšía bola jednorázová aplikácia do nádoru, jednorázová i opakovaná intraperitoneálna aplikácia a opakované podanie do nádoru boli menej účinné.

Po štyroch týždňoch liečby, keď ešte nedošlo k úplnému odhojeniu liečených nádorov, sme tieto i kontrolné vyoperovali a previedli na tkanivovú kultúru. Novovytvorené bunkové línie sme podrobili rovnakým testom ako pôvodnú líniu TC-1 a všetky sme porovnali. Bunky z reovírusom liečeného nádoru boli v prvej pasáži odolnejšie k účinkom reovírusu, v ďalších pasážach však túto rezistenciu stratili.

Naše pokusy *in vitro* potvrdili selektivitu reovírusu. Pokusy *in vitro* a vyšetrenia buniek ovplyvnených *in vivo* reovírusom naznačujú, že terapeutický efekt reovírusu môže byť negatívne ovplyvnený protivírusovou imunitou (menší účinok opakovanej než jednorázovej aplikácie) i rezistenciou časti buniek k vírusovej infekcii.

V súčasnej dobe sa zaoberáme experimentami vedúcimi k objasneniu súčinnosti reovírusu s imunosupresívnou liečbou cyklofosfamidom.

Práca je podporovaná grantami GACR 301/05/2240 a dMSMT0021620813.

Literatura

1. Norman KL and Lee PW. (2000). J. Clin. Invest., 105, 1035-1038.
2. Sinkovics JG and Horvath JC. (2000). J. Clin. Virol., 16, 1-15.
3. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N and Bell JC. (2000). Nat. Med., 6, 821-825.
4. Farassati F, Yang AD and Lee PW. (2001). Nat. Cell Biol., 3, 745-750.
5. Martuza RL. (2000). J. Clin. Invest., 105, 841-846
6. Bergmann M, Romirer I, Sachet M, Fleischhacker R, Garcia-Sastre A, Palese P, Wolff K, Pehamberger H, Jakesz R and Muster T. (2001). Cancer Res., 61, 8188-8193.
7. Dobbstein M. (2004). Curr. Top. Microbiol. Immunol., 273, 291-334.
8. Wek RC. (1994). Trends Biochem. Sci., 19, 491-496.
9. de Haro C, Mendez R and Santoyo J. (1996). FASEB J., 10, 1378-1387.
10. Brostrom CO and Brostrom MA. (1998). Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 58, 79-125.