

## ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ РЕОВИРУС Р-92: ЭФФЕКТ ПРИ ГЕНЕРАЦИИ ЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*)

© 2019 г. А. О. Ситковская<sup>1\*</sup>, И. В. Межевова<sup>1</sup>, Е. С. Бондаренко<sup>1</sup>, С. А. Колпаков<sup>2</sup>, Е. П. Колпакова<sup>2</sup>, А. А. Кармиргодиев<sup>1</sup>, П. С. Панченко<sup>1</sup>

\*E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

Проводилось исследование влияния реовируса (штамм Р-92) на созревание дендритных клеток (ДК), полученных из МНК периферической крови здоровых доноров, в т.ч., при нагрузке опухолевым антигеном. Результаты показали, что внесение реовируса штамма Р-92 на этапе нагрузки антигеном незрелых ДК стимулирует экспрессию ключевых маркеров, характеризующих их созревание, костимулирующую и презентующую активность.

**Ключевые слова:** онколитические вирусы, реовирус Р-92, дендритно-клеточные вакцины

DOI: 10.31857/S102872210006540-9

Адрес: 344037, Ростов-на-Дону, ул. 14-линия, 63, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, лаборатория клеточных технологий, Ситковская Анастасия Олеговна.

Тел.: 8 919 879 16 61 (моб.).

E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Авторы:

**Ситковская А. О.**, врио зав. лаб. клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

**Межевова И. В.**, м.н.с. лаб. клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

**Бондаренко Е. С.**, м.н.с. лаб. иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

**Колпаков С. А.**, к.м.н., с.н.с. лаб. вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «РНИИМП» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

**Колпакова Е. П.**, н.с. лаб. вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «РНИИМП» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

**Кармиргодиев А. А.**, студент ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

**Панченко П. С.**, студент ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия.

Вопрос об активации иммунной системы больных раком с помощью биотерапии является актуальным. Один из таких подходов – введение пациентам дендритно-клеточной вакцины

(ДКВ), которая, к сожалению, не всегда показывает эффективные результаты. Перспективным методом индукции противоопухолевого действия является использование онколитических вирусов (ОВ), целенаправленно за счет ряда механизмов воздействующих на опухолевые клетки [1], что приводит к высвобождению из них различных антигенов. Вместе с тем, ОВ сами являются экзогенными антигенами. Мы придерживались гипотезы, что стимуляция дендритных клеток (ДК) под влиянием подобных антигенов может способствовать усилению генерации антиген-специфических лимфоцитов против опухолевых клеток [2].

**Целью** нашей работы являлось изучение возможности повышения эффективности созревания дендритных клеток, в т.ч., при их нагрузке опухолевым антигеном *in vitro* с помощью добавления реовируса штамма Р-92.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве вирусного агента использовался реовирус штамм Р-92 (3 серотипа), охарактеризованный ранее [3]. Генерацию ДК проводили из моноцитов, полученных из периферической

крови здоровых доноров с использованием ИЛ-4 (20 нг/мл), GM-CSF (72 нг/мл). На 7-й день инкубации проводили фенотипирование на проточном цитофлуориметре (FACSCantoII, BD). Для определения незрелых ДК оценивали экспрессию маркера CD1a. Далее клетки в равной пропорции пересаживали на 3 культуральных флакона в кондиционированной среде, добавляли также ИЛ-4, GM-CSF и TNF- $\alpha$  (20 нг/мл) вместе с индивидуальной антигенной нагрузкой для каждого флакона: А) лизат культуры клеток HeLa; Б) реовирус + лизат культуры клеток HeLa, полученный, как описано ранее [4]; В) реовирус, культивируемый в стандартной культуре клеток СПЭВ. Через 48 часов образцы фенотипировали с целью определения экспрессии антигенов CD80/CD83/CD86/HLA-DR/CD1a/CD45 (BD), позволяющих охарактеризовать созревание ДК.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

При достижении 25% экспрессии CD1a на культивируемых ДК их нагружали антигенами. Результаты фенотипирования ДК после антигенной нагрузки показали, что экспрессия CD80 при добавлении реовируса в образцах Б и В была выше в 1,3 и 1,2 раза соответственно, чем в пробе А. Наибольшее количество CD86 наблюдалось в образце Б (95,3%), а CD83 — при нагрузке незрелых ДК только реовирусом (72,9%). Маркер HLA-DR экспрессировался на 72,1% клеток в образце А, 90,4% — в образце Б и 92,3% в образце В. Максимальная коэкспрессия CD80/CD86 наблюдалась при нагрузке ДК антигенами HeLa и реовирусом Р-92.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что добавление реовируса Р-92 способствует усилению созревания ДК, о чем свидетельствует повышение экспрессии ключевого маркера зрелых ДК (CD83), маркеров (CD80/CD86), обеспечивающих костимулирующие сигналы, необходимые для активации и выживания Т-клеток, а также рецептора клеточной поверхности МНС класса II (HLA-DR), ответственного за презентацию чужеродных антигенов Т-клеткам. Таким образом, реовирус Р-92 можно рассматривать

как адъювант при генерации ДК, нагруженных опухолевым антигеном, из моноцитов периферической крови здоровых доноров.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ситковская А. О., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Кит О. И. Вирус болезни Ньюкасла и иммунитет — эффективный альянс в борьбе против рака (обзор литературы). Сибирский онкологический журнал. 2018, 17(6), 105–113. [Sitkovskaya A. O., Zlatnik E. Yu., Novikova I. A., Kit O. I. Newcastle disease virus and immunity — an effective alliance against cancer (literature review). Siberian Oncology Journal. 2018, 17 (6), 105–113].
2. Златник Е. Ю., Ситковская А. О., Непомнящая Е. М., Джандигова Ф. Р., Ващенко Л. Н. Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. Казанский медицинский журнал. 2018, 5, 792–801. [Zlatnik E. Yu., Sitkovskaya A. O., Nepomnyashchaya E. M., Dzhandigova F. R., and Vashchenko L. N. Achievements and prospects of cellular technologies based on activated lymphocytes in the treatment of malignant tumors. Kazan Medical Journal. 2018, 5, 792–801].
3. Колпаков С. А., Колпакова Е. П. Неклассифицированные вирусы человека семейства *Reoviridae*. В сборнике: Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний на юге России. Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. 2016, 243–247. [Kolpakov S. A., Kolpakova E. P. Unclassified human viruses of the *Reoviridae* family. In the collection: Current Issues of Diagnostics and Prevention of Infectious and Parasitic Diseases in the South of Russia. Materials of the interregional scientific-practical conference with international participation. 2016, 243–247].
4. Ситковская А. О., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Колпаков С. А., Колпакова Е. П., Потемкин Д. С., Васильченко Н. Г., Триандафилиди Е. И., Быкадорова О. В. Исследование возможности онколитических эффектов *in vitro* вирусов из семейств *Reoviridae* и *Paramyxoviridae*. Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2018, 4(200), 124–130. [Sitkovskaya A. O., Zlatnik E. Yu., Novikova I. A., Kolpakov S. A., Kolpakova E. P., Potemkin D. S., Vasilchenko N. G., Triandafilidi E. I., Bykadorova O. V. Investigation of the possibility of oncolytic effects of *in vitro* viruses from the *Reoviridae* and *Paramyxoviridae* families. University news. North Caucasus region. Natural Sciences. 2018, 4 (200), 124–130].

## ONCOLYTIC REOVIRUS R-92: EFFECT IN THE GENERATION OF MATURE DENDRITIC CELLS (RESEARCH *IN VITRO*)

© 2019 A. O. Sitkovskaya<sup>1\*</sup>, I. V. Mezhevova<sup>1</sup>, E. S. Bondarenko<sup>1</sup>, S. A. Kolpakov<sup>2</sup>, E. P. Kolpakova<sup>2</sup>, A. A. Karmirgodiev<sup>1</sup>, P. S. Panchenko<sup>1</sup>

\*E-mail: [grankina.anastasia@mail.ru](mailto:grankina.anastasia@mail.ru)

<sup>1</sup>Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia;

<sup>2</sup>FBUN «Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology» of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 26.03.2019

Study was conducted of the effect of reovirus strain R-92 on the maturation of dendritic cells (DC). Work was carried out on PBMCs from the peripheral blood of healthy donors. The results showed that the presence of reovirus strain P-92 at the stage of differentiation of immature DC into a mature state leads to increased expression of key markers of mature DC.

*Key words:* oncolytic viruses, reovirus R-92, dendritic cell vaccines

### Authors:

**Sitkovskaya A. O.**, ✉ Head of Lab. of the Cell Technology, Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia.

**E-mail:** [grankina.anastasia@mail.ru](mailto:grankina.anastasia@mail.ru);

**Mezhevova I. V.**, Junior researcher of the Lab. of tumor immunophenotyping, Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

**Bondarenko E. S.**, Junior researcher of the Lab. of tumor immunophenotyping, Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

**Kolpakov S. A.**, Ph.D., Senior Researcher, Lab. of Virology, Microbiology and Molecular Biological Research Methods, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

**Kolpakova E. P.**, Researcher, Lab. of Virology, Microbiology and Molecular Biological Research Methods of the Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

**Karmirgodiev A. A.**, student of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

**Panchenko P. S.**, student of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia.