

УДК 576.536;57.083;612.017.12

ВЛИЯНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО РЕОВИРУСА Р-92 НА СОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И ГЕНЕРАЦИЮ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO*

© 2019 г. А. О. Ситковская¹*, Е. Ю. Златник¹, И. В. Межевова¹, Е. С. Бондаренко¹, С. А. Колпаков², Е. П. Колпакова², И. А. Новикова¹

¹“Ростовский научно-исследовательский онкологический институт” Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, 344037 Россия

²“Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии” Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, 344000 Россия

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

Поступила в редакцию 22.03.2019 г.

После доработки 09.04.2019 г.

Принята к публикации 15.04.2019 г.

Применение онколитических вирусов (ОВ) является перспективным методом ингибирования опухолевого роста. ОВ оказывают как прямое противоопухолевое, так и косвенное иммуностимулирующее действие. Известно, что при онкологических патологиях нарушено распознавание опухолевого антигена клетками иммунной системы. Стимуляция дендритных клеток (ДК) под действием опухолевых антигенов совместно с вирусами, возможно, усилит генерацию антиген-специфических лимфоцитов против опухолевых клеток, которые в свою очередь могут быть эффективным инструментом противоопухолевых клеточных технологий. Цель настоящей работы заключалась в выяснении возможности использования реовируса штамма Р-92 для генерации опухолеспецифических Т-лимфоцитов *in vitro*. Нами установлено, что при дифференцировке ДК в присутствии реовируса Р-92 увеличивается выход зрелых ДК. Помимо этого образец ДК с нагрузкой антигенами HeLa после сокультивирования с лимфоцитами и культурой HeLa не показал активного цитолитического действия, наблюдали лишь цитостатический эффект, в отличие от образцов с добавленным реовирусом Р-92. Таким образом, антиген, представляющий собой культуру клеток HeLa, культивированную с реовирусом Р-92 в описанных нами условиях, можно предложить в качестве эффективного экспериментального продукта для клеточной иммунотерапии опухолей.

Ключевые слова: онколитические вирусы, биотерапия, реовирус Р-92, дендритные клетки, антиген-специфические лимфоциты

DOI: 10.1134/S0041377119070095

В последнее время большое внимание уделяется иммунной системе онкологических больных и ее активации с помощью биологической терапии. Биологические методы лечения, включая иммунотерапию и терапию онколитическими вирусами (ОВ), по мнению некоторых авторов, часто являются более физиологичными и хорошо переносимыми, чем химиолучевая терапия (Schirmmacher, 2018). Применение ОВ является перспективным методом ингибирования опухолевого роста. Отличительной чертой ОВ является их способность к избирательному инфицированию и уничтожению раковых клеток (Нетёсов и др., 2011), избегая нормальные, что ведет к стимуляции долгосрочных противоопухолевых иммунных реакций (Marelli et al., 2018). Вирусный он-

колизис в сочетании со стандартной терапией рассматривается в литературе в качестве нового эффективного подхода к лечению рака (Ottolino-Perry et al., 2010). Существует множество свидетельств об онколитических свойствах ряда вирусов из различных семейств, таких как аденовирусы, герпесвирусы, реовирусы, парвовирусы, пикорнавирусы, поксвирусы, парамиксовирусы (Schirmmacher, 2018). Проводятся клинические испытания с использованием онколитической виротерапии, например, вакцин Reolysin (Eissa et al., 2018) и JX-594 (Heinrich et al., 2017). Несколько препаратов на основе вирусов уже используются в онкотерапии: Rigvir, Oncorine (Нетёсов и др., 2011), Talimogene Laherparepvec или T-VEC (Andtbaccka et al., 2015; Габдрахманова, 2017; Heinrich et al., 2017; Marelli et al., 2018). Среди Российских разработок необходимо отметить препарат Канцеролизин, созданный в Научном центре вирусологии и биотех-

Принятые сокращения: ДК — дендритные клетки, ДКВ — дендритно-клеточные вакцины, МНК — моноклеарные клетки периферической крови, ОВ — онколитические вирусы, СПЭВ — культура клеток почек эмбрионов свиньи.

нологии “Вектор” на основе штамма Adel2 (Разумов и др., 2013).

Распознавание антигена является важнейшим звеном иммунного ответа, и, прежде всего, именно оно нарушено при реакции на опухолевые антигены в связи с их недостаточной чужеродностью для организма опухоленосителя. Разработка различных методов стимуляции этого процесса является актуальной задачей для иммунотерапии опухолей. В литературе описан ряд адъювантов в виде химиопрепаратов или веществ растительного происхождения, применяемых при дендритноклеточной вакцинации (ДКВ) для усиления иммуногенности (Водолажский и др., 2017). В этой связи представляют определенную перспективу и ОВ, способные лизировать опухолевые клетки с высвобождением из них различных антигенов и, кроме того, являющиеся экзогенными антигенами. Мы исходили из гипотезы, что стимуляция ДК под действием таких антигенов способна усилить генерацию антиген-специфических лимфоцитов против опухолевых клеток, которые в свою очередь могут быть эффективным инструментом противоопухолевых клеточных технологий (Златник и др., 2018).

Ранее нами была показана онколитическая активность реовируса Р-92 *in vitro* на нескольких опухолевых клеточных линиях (Ситковская и др., 2018б); мы предполагаем, что полученные опухолевые лизаты можно использовать при создании клеточных продуктов для иммунотерапии опухолей.

Цель настоящей работы заключалась в изучении возможности использоваться реовирус штамма Р-92 для генерации опухолеспецифических Т-лимфоцитов *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Исследовали эффективность нагрузки незрелых дендритных клеток (ДК) онколитическим реовирусом человека Р-92 (предположительно 3-го серотипа). Данный вирус выделен от больного инфекционным гепатитом, адаптирован к росту на культуре СПЭВ, при многократных пассажах утратил патогенность, охарактеризован электронно-микроскопическими, серологическими методами и с помощью ПЦР (Колпаков, Колпакова, 2014). Депонирован в Государственной коллекции вирусов Научно-исследовательского института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН как производственный штамм (№ 2363 от 17.02.2003 г.). Для нашей работы реовирус человека Р-92 был предоставлен С.А. Колпаковым. Культура клеток HeLa получена из Российской коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Получение мононуклеарных клеток (МНК) и лимфоцитов. Из локтевой вены здоровых доноров с помощью вакутейнера производили забор периферической крови в объеме 100 мл в пробирки BD Vacutainer® СРТ™, содержащие раствор фикола

(Ficoll™ Нупаке™ Solution, плотность 1.077), забуференный антикоагулянт гепарин натрия и инертный гелевый барьер (Becton Dickinson, США). Пробирки с материалом центрифугировали 25 мин при 1700 g. Во время центрифугирования гель образует физический барьер между МНК в плазме и эритроцитами и гранулоцитами. Из фракции, оседающей над градиентом плотности (мутное белесое кольцо) дозатором отбирали суспензию МНК. Полученные клетки отмывали раствором Хенкса (Биолот, Россия) и пассировали в 2 культуральных флаконах Т75 (Biofil, Китай) для 2-х часовой адгезии моноцитов в питательной среде RPMI-1640 (Биолот, Россия), после чего питательную среду с неприкрепленными клетками (лимфоцитами) переносили в стерильные центрифужные пробирки и аликвотировали по 10 млн кл./мл в криопробирки, замораживали при -80°C для дальнейших исследований.

Дифференцировку моноцитов в незрелые ДК проводили по общепринятой методике в течение 7 сут в питательной среде для дифференцировки ДК (Cell-Genix, Германия), добавляя на 1-, 3- и 5-е сут культивирования интерлейкин-4 (IL-4; 20 нг/мл, SCI Store, Россия) и гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор (ГМ-КСФ; 72 нг/мл, SCI Store, Россия) (Балдуева и др., 2012). Через 7 сут культивирования клетки снимали со дна флакона раствором Версена для проведения иммунофенотипирования методом проточной цитофлуориметрии с помощью проточного цитофлуориметра (FACSCantoII, Becton Dickinson, США) с использованием панели моноклональных антител к антигенам дифференцировки: CD14 (FITC), CD1a (PE), CD80 (PE-Cy7), CD11c (APC), CD45 (APC-Cy7) (Becton Dickinson, США). Ключевым маркером для определения доли незрелых ДК являлся CD1a.

После снятия клетки пересевали в 3 флакона Т25 (по 1.5×10^5 клеток в каждый) в кондиционную среду после дифференцировки моноцитов в незрелые ДК, добавляя IL-4 (20 нг/мл, SCI Store, Россия), гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор (GM-CSF, 72 нг/мл, SCI Store, Россия), фактор некроза опухолей (TNF α ; 20 нг/мл, SCI Store, Россия), а также антигенную нагрузку, индивидуальную для каждого из трех флаконов: только лизат культуры клеток HeLa (контроль); реовирус совместно с лизатом клеток HeLa, полученный в результате лизирования реовирусом клеток HeLa при совместном культивировании (экспериментальный образец 1), как описано ранее (Ситковская и др., 2018б); только реовирус, культивируемый в стандартной культуре клеток СПЭВ (экспериментальный образец 2). Через 48 ч нагруженные ДК снимали с культуральных флаконов раствором Версена и проводили фенотипирование с использованием панели моноклональных антител к антигенам дифференцировки: CD80 (PE-Cy7), CD83 (APC), CD86 (PE), HLA-DR (PE-Cy7), CD197 (FITC), CD45

(APC-Cy7) (Becton Dickinson, США), позволяющей охарактеризовать созревание ДК.

Сокультивирование ДК, аутологических лимфоцитов и клеток HeLa. В течение 5 сут проводили сокультивирование полученных зрелых ДК с аутологичными лимфоцитами в соотношении 3 : 1 в лунках 6-луночных планшетов в питательной среде RPMI-1640 (Биолот, Россия), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия), после чего в образцы вносили по 1.5×10^5 клеток HeLa в качестве клеточ-мишеней. Культуру клеток HeLa культивировали в питательной среде RPMI-1640 (Биолот, Россия), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия) и 0.5% пенициллина-стрептомицина (Биолот, Россия). Через 48 ч все клетки из образцов собирали и проводили окончательное фенотипирование с использованием панели моноклональных антител к антигенам дифференцировки: CD80 (PE-Cy7), CD83 (APC), CD86 (PE), HLA-DR (PE-Cy7), CD38 (PE), CD25 (APC), CD127 (PE), CD3 (PerCP-Cy5-5; FITC), CD4 (PE-Cy7; FITC), CD8 (APC-Cy7), CD16/56 (PE), CD19 (APC), CD45 (PerCP-Cy5-5) (Becton Dickinson, США). Количество погибших и живых клеток-мишеней определяли в гемоцитометре с помощью окрашивания трипановым синим.

Все этапы культивирования клеток проводили в условиях 5% CO₂ при температуре 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На этапе получения незрелых ДК маркер CD1a был обнаружен на 25% клеток, что говорит об эффективной дифференцировке моноцитов в незрелые ДК.

Результаты иммунофенотипирования после этапа антигенной нагрузки ДК показали, что при наличии реовируса в образцах увеличивается доля зрелых и активированных ДК по сравнению с контролем, о чем можно судить по экспрессии маркера CD83 (рис. 1) и коэкспрессии маркеров CD86 и HLA-DR (рис. 2а). Показатели экспрессии ключевого поверхностного антигена зрелых ДК (CD83) были максимальными после нагрузки ДК реовирусом (98.1%).

При исследовании влияния ДК (после нагрузки антигенами различных вариантов) на процессы активации лимфоцитов через 1 сут после совместного культивирования зрелых ДК и лимфоцитов наблюдали наибольшую экспрессию маркера ранней активации CD38 на CD8⁺-лимфоцитах, наблюдаемую при использовании ДК, нагруженных лизатом HeLa, полученном при действии реовируса. В той же пробе наблюдали наиболее высокие показатели коэкспрессии активационных маркеров на CD4⁺-лимфоцитах, однако они были ниже по сравнению с CD8⁺-клетками, составляя 4.2% для лимфоцитов CD4⁺CD38⁺ и 1.0% для лимфоцитов CD4⁺HLA-DR⁺. Наибольшее количество Т-регуляторных кле-

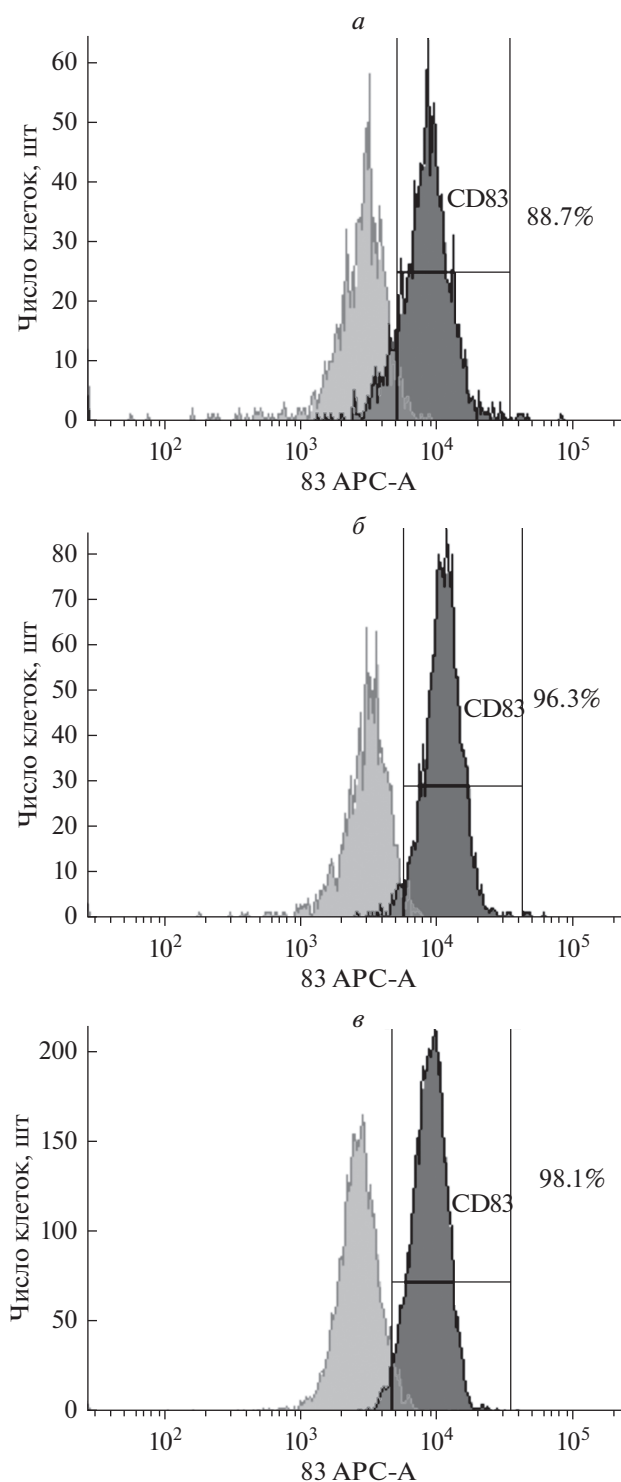


Рис. 1. Экспрессия маркера CD83 дендритными клетками (ДК; *правые гистограммы*) через 48 ч после нагрузки различными антигенами. В качестве негативного контроля использованы лимфоциты (*левые гистограммы*). Данные проточной цитометрии. *а* – Антигенная нагрузка ДК только лизатом клеток HeLa; *б* – антигенная нагрузка ДК реовирусом и лизатом HeLa; *в* – антигенная нагрузка ДК только реовирусом.

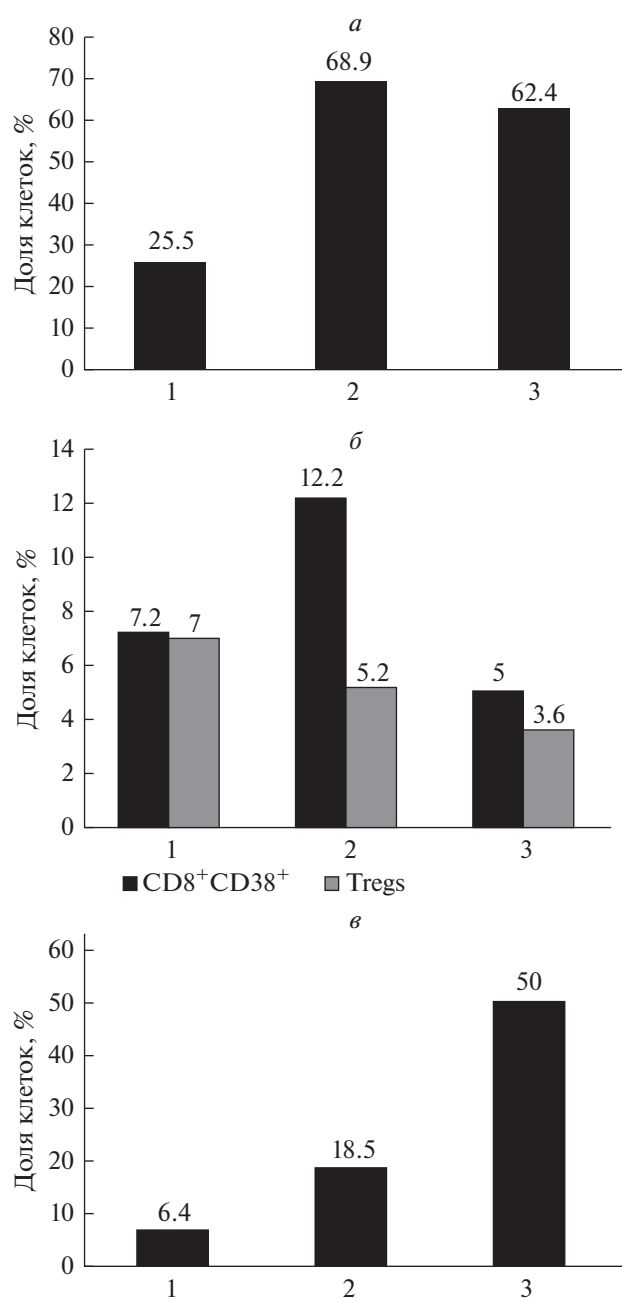


Рис. 2. Влияние разных вариантов антигенной нагрузки на иммунофенотип ДК и лимфоцитов. *а* – Доля активированных ДК (%) после нагрузки различными антигенами; *б* – доля активированных Т-киллеров CD8⁺/CD38⁺ и Т-регуляторных клеток (Тregs) через 1 сут после сокультивирования с ДК, нагруженными различными антигенами; *в* – доля Т-клеток CD3⁺ через 2 сут после сокультивирования с ДК, нагруженными различными антигенами при совместном культивировании ДК, лимфоцитов и клеток HeLa.

Столбцы: 1 – антигенная нагрузка ДК лизатом HeLa; 2 – антигенная нагрузка ДК реовирусом и лизатом HeLa; 3 – антигенная нагрузка ДК реовирусом. *Цифры над столбцами* – доля клеток (%).

ток с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127_{low} отмечено в контроле (HeLa без реовируса) (рис. 2б).

Итак, оценка способности исследуемых вариантов ДК активировать лимфоциты показала преимущество ДК, нагруженных лизатом HeLa, полученном под действием реовируса, на Т-цитотоксическое звено уже через 1 сут сокультивирования, перед контрольным вариантом.

Далее оценивали цитотоксическое действие сокультивируемых лимфоцитов и ДК против клеток-мишеней (клеток HeLa). Для этого на 5-е сутки сокультивирования ДК и лимфоцитов к ним добавляли культуру HeLa по 1.5×10^5 клеток (в соотношении с ДК 1 : 1) и продолжали культивирование.

Отмеченные различия нашли реализацию на финальном этапе исследования, а именно, при оценке цитотоксического действия сокультивируемых лимфоцитов и ДК (контрольные и экспериментальные образцы) против клеток-мишеней (клеток HeLa). После 48-часового сокультивирования зрелых ДК, аутологических лимфоцитов и клеток-мишеней HeLa, клетки всех образцов собирали, считали и проводили иммунофенотипирование. В контрольном варианте опухолевые клетки сохранялись в количестве, равном первоначально внесенному, хотя в этих же образцах отмечали наибольшую популяцию зрелых ДК (81.9%). Напротив, в обоих экспериментальных вариантах опухолевые клетки полностью отсутствовали; при этом в них обнаружено более высокое количество Т-лимфоцитов по сравнению с контролем (рис. 2в).

ОБСУЖДЕНИЕ

Введение дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами, с целью активации цитотоксических лимфоцитов для распознавания и элиминации опухолевых клеток, известно как одно из современных иммунотерапевтических воздействий, получающих все большее развитие и в России, и в мире (Балдуева и др., 2012; Vasaturo et al., 2013). Однако препятствием для эффективной реализации этого метода является иммуносупрессия, формирующаяся в микроокружении опухоли (Teng et al., 2015).

В настоящее время возрастает интерес к применению вирусов, способных к естественному онколизму, причем их противоопухолевое действие может частично опосредоваться через иммунную систему (Heinrich et al., 2017; Ситковская и др., 2018а; Santry et al., 2018). Ряд апатогенных вирусов обладает двухфазным действием: онколитическим и иммуномодулирующим, в ходе которого происходит высвобождение антигенов при лизисе опухолевых клеток и развитие иммунного ответа на них, при этом сам вирус может служить адъювантом. Хотя при поиске оптимальных для поставленной цели ОВ учитывается возможность индукции максимального противоопухолевого и минимального противовирусного им-

мунитета (Schirmacher, 2018), даже при развитии ответа на вирус его адъювантное действие должно привести к ответу и на антигены опухолевых клеток, реализуясь в лизисе последних.

Для нас представляла интерес возможность объединения таких подходов, как онколитическая виротерапия и противоопухолевая вакцинация с перспективой потенцирования их эффектов. Известна работа (Schirmacher et al., 2017), выполненная в условиях надлежащей производственной практики GMP (good manufacturing practice) по получению ДК, нагруженных лизатом аутологичных опухолевых клеток, инфицированных вирусом болезни Ньюкасла; авторы предполагают, что такой биотерапевтический продукт может демонстрировать не только локальный противоопухолевый, но и системный анти-метастатический эффект.

Однако ранее, используя широкую панель опухолевых культур клеток *in vitro*, мы не обнаружили выраженного цитопатического действия вируса болезни Ньюкасла, тогда как аналогичные эксперименты с реовирусом штамма Р-92 продемонстрировали активный лизис опухолевых клеток (Ситковская и др., 2018б). В связи с этим, а также на основании данных о его апатогенности (Колпаков, Колпакова, 2014), мы предприняли генерацию дендритных клеток с помощью реовируса.

Результаты нашей работы показали, что использование реовируса для нагрузки незрелых ДК способствует стимуляции их созревания, а также экспрессии поверхностных маркеров, ответственных за презентацию антигена Т-клеткам (CD86, HLA-DR). ДК, нагруженные лизатом HeLa, полученным под действием реовируса, при сокультивировании с лимфоцитами способствуют не только их активации, но и снижению среди них доли иммуносупрессивных Т-регуляторных клеток. По-видимому, более активная стимуляция лимфоцитов (преимущественно CD8⁺) такими ДК приводит к полной гибели опухолевых клеток-мишеней при сокультивировании с ними. Сохранность опухолевых клеток в контрольном варианте сокультивирования может свидетельствовать о цитостатическом эффекте, так как пролиферации клеток не наблюдали, однако и лизис их не обнаружен. Несмотря на то, что контрольный вариант антигена индуцирует максимальное количество ДК с иммунофенотипом зрелых клеток, цитотоксичности в отношении клеток-мишеней не было отмечено, что, по нашему предположению, связано с недостаточно эффективной межклеточной кооперацией антиген-презентирующих и антиген-распознающих клеток в данном случае. Вероятно, ДК вакцины с антигенной нагрузкой, проводимой общепринятым методом, лишь ингибируют рост и развитие опухолевых кле-

ток, возможным исходом чего может являться индукция апоптотических механизмов.

Реовирус Р-92 не только подавляет развитие опухолевых клеток, но и оказывает прямое литическое действие, что представляется критичным при необходимости уменьшения опухолевой массы.

Таким образом, антиген, представляющий собой культуру клеток HeLa, культивированную с реовирусом Р-92, можно предложить в качестве эффективного экспериментального продукта для клеточной иммунотерапии опухолей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания (Рег. № НИОКТР АААА-А18-118072790017-9 “Разработка и применение новых методов клеточных технологий для иммунотерапии опухолей”) Ростовского научно-исследовательского онкологического института Минздрава РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа была одобрена этическим комитетом Ростовского научно-исследовательского онкологического института Минздрава России, протокол № 33/1 от 29.11.2018г. Доноры подписывали информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балдуева И.А., Новик А.В., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Проценко С.А., Петрова Т.Ю., Улейская Г.И., Шёкина Л.А., Семёнова А.И., Михайличенко Т.Д., Телетаева Г.М., Жабина А.С., Волков Н.В., Комаров Ю.И. 2012. Клиническое исследование (II фаза) вакцины на основе аутологичных дендритных клеток с иммунологическим адъювантом у больных с меланомой кожи. Вопросы онкологии. 58(2) : 212–221. (Baldueva I.A., Novik A.V., Moiseenko V.M., Nexaeva T.L., Danilova A.B., Danilov A.O., Procenko S.A., Petrova T.Yu., Ulejskaya G.I., Shhyokina L.A., Semyonova A.I., Mixajlichenko T.D., Teletaeva G.M., Zhabina A.S., Volkov N.V., Komarov Yu.I. 2012. Clinical study (phase II) of vaccines based on autologous dendritic cells with an immunological adjuvant in patients with skin melanoma. Questions oncology. 58(2) : 212–221.)
- Водолажский Д.И., Кит О.И., Могущкова Х.А., Пушкин А.А., Тимошкина Н.Н. 2017. Раковые тестикулярные антигены в иммунотерапии злокачественных опухолей. Сибирский онкологический журнал. 16(2) : 71–81. (Vodolazhsky D.I., Kit O.I., Mogushkova Kh.A., Pushkin A.A., Timoshkina N.N. 2017. Cancer testicular antigens in immunotherapy of malignant tumors. Siberian Oncol. J. 16(2) : 71–81.)

- Габдрахманова А.Ф. 2017. Вирусный онколиз. Таврический научный обозреватель. 1(18) : 151–153. (*Gabdrakhmanova A.F.* 2017. Viral oncolysis. Tauride Sci. Observer. 1(18) : 151–153.)
- Златник Е.Ю., Ситковская А.О., Непомнящая Е.М., Джандигова Ф.Р., Ващенко Л.Н. 2018. Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. Казанский медицинский журнал. 99 (5) : 792–801. (*Zlatnik E.Y., Sitkovskaya A.O., Nepomnyashchaya E.M., Jandigova F.R., Vashchenko L.N.* 2018. Achievements and perspectives of cell technologies based on activated lymphocytes in the treatment of malignant tumors. Kazan Medical J. 99(5) : 792–801.)
- Колпаков С.А., Колпакова Е.П. 2014. Особенности выделения РНК реовируса из клинического материала. Живые и биокосные системы. 10. URL: <http://jbks.ru/archive/issue-10/article-5>. (*Kolpakov S.A., Kolpakova E.P.* 2014. Features of the isolation of reovirus RNA from clinical material. Zhivyye I Biokosnyye Sistemy. 10. URL: <http://jbks.ru/archive/issue-10/article-5>.)
- Нетёсов С.В., Кочнева Г.В., Локтев В.Б., Святченко В.А., Сергеев А.Н., Терновой В.А., Тикунова Н.В., Шишкина Л.Н., Чумаков П.М. 2011. Онколитические вирусы: достижения и проблемы. Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария. 3 : 26–33. (*Netyosov S.V., Kochneva G.V., Loktev V.B., Svyatchenko V.A., Sergeev A.N., Ternovoj V.A., Tikunova N.V., Shishkina L.N., Chumakov P.M.* 2011. Oncolytic viruses: Achievements and challenges. Medical alphabet. Epidemiol. Sanitation. 3 : 26–33.)
- Разумов И.А., Святченко В.А., Протопопова Е.В., Кочнева Г.В., Киселёв Н.Н., Губанова Н.В., Шилов А.Г., Мордвинов В.А., Нетёсов С.В., Чумаков П.М., Локтев В.Б. 2013. Оценка онколитической активности ряда ортопоксвирусов, аденовирусов и парвовирусов в отношении клеток глиом человека. Вестник РАМН. 12 : 4–8. (*Razumov I.A., Svyatchenko V.A., Protopopova E.V., Kochneva G.V., Kiselyov N.N., Gubanova N.V., Shilov A.G., Mordvinov V.A., Netyosov S.V., Chumakov P.M., Loktev V.B.* 2013. Evaluation of the oncolytic activity of a number of orthopoxviruses, adenoviruses and parvoviruses in relation to human gliomas. Bulletin of RAMS. 12 : 4–8.)
- Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Кит О.И. 2018а. Вирус болезни Ньюкасла и иммунитет – эффективный альянс в борьбе против рака (обзор литературы). Сибирский онкологический журнал. 17(6) : 105–113. (*Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Kit O.I.* 2018a. Newcastle disease virus and immunity is an effective alliance against cancer (literature review). Siberian J. Oncol. 17(6) : 105–113.)
- 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. 2018б. Исследование возможности онколитических эффектов *in vitro* вирусов из семейств *Reoviridae* и *Paramyxoviridae*. Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 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.* 2018b. Study of the possibility of *in vitro* oncolytic effects of the viruses of the families *Reoviridae* and *Paramyxoviridae*. News Universities. North Caucasus Region. Natural Science. 4(200) : 124–130.)
- Andtbacka R.H., Kaufman H.L., Collichio F., Amatruda T., Senzer N., Chesney J., Delman K.A., Spitler L.E., Puzanov I., Agarwala S.S., Milhem M., Cranmer L., Curti B., Lewis K., Ross M., Guthrie T., Linette G.P., Daniels G.A., Harrington K., Middleton M.R., Miller W.H., Jr, Zager J.S., Ye Y., Yao B., Li A., Doleman S., VanderWalde A., Gansert J., Coffin R.S. 2015. Talimogenelaprepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. J. Clin. Oncol. 33 : 2780–2788.
- Eissa I., Bustos-Villalobos I., Ichinose T., Matsumura S., Naoe Y., Miyajima Morimoto D., Mukoyama N., Zhiwen W., Tanaka M., Hasegawa H., Sumigama S., Aleksic B., Kadera Y., Kasuya H. 2018. The current status and future prospects of oncolytic viruses in clinical trials against melanoma, glioma, pancreatic, and breast cancers. Cancers. 10 : 356–378.
- Heinrich B., Klein J., Delic M., Goepfert K., Engel V., Geberzahn L., Lusky M., Erbs P., Preville X., Moehler M. 2017. Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma *in vitro* model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes. Onco Targets Ther. 10 : 2389–2401.
- Marelli G., Howells A., Lemoine N.R., Wang Y. 2018. Oncolytic viral therapy and the immune system: a double-edged sword against cancer. Front. Immunol. 9 : 866–873.
- Ottolino-Perry K., Diallo J.S., Lichty B.D., Bell J.C., McCart J.A. 2010. Intelligent design: combination therapy with oncolytic viruses. Mol. Ther. 18 : 251–263.
- Santry L.A., McAusland T.M., Susta L., Wood G.A., Major P.P., Petrik J.J., Bridle B.W., Wootton S.K. 2018. Production and purification of high-titer Newcastle disease virus for use in preclinical mouse models of cancer. Mol. Ther. Meth. Clinical Devel. 9 : 181–191.
- Schirmacher V. 2018. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). Int. J. Oncol. 54 : 407–419.
- Schirmacher V., Lorenzen D., Van Gool S.W., Stuecker W. 2017. A new strategy of cancer immunotherapy combining hyper-thermia/oncolytic virus pretreatment with specific autologous anti-tumor vaccination. A review. Austin Oncol. Case Rep. 2 (1) : 1–8.
- Teng M.W., Ngiew S.F., Ribas A., Smyth M.J. 2015. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. Cancer Res. 75 : 2139–2145.
- Vasaturo A., Di Blasio S., Peeters D.G., de Koning C.C., de Vries J.M., Figdor C.G., Hato S.V. 2013. Clinical implications of co-inhibitory molecule expression in the tumor microenvironment for DC vaccination: A game of stop and go. Front. Immunol. 4 : 417. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00417>

THE *IN VITRO* EFFECT OF ONCOLYTIC REOVIRUS P-92 ON DENDRITIC CELLS MATURATION AND THE GENERATION OF TUMOR-SPECIFIC T-LYMPHOCYTES

A. O. Sitkovskaya^{a, *}, E. Yu. Zlatnik^a, I. V. Mezheva^a, E. S. Bondarenko^a, S. A. Kolpakov^b,
E. P. Kolpakova^b, and I. A. Novikova^a

^aRostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, 344037 Russia

^bRostov Research Institute of Microbiology and Parasitology of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, 344000 Russia

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

The use of oncolytic viruses (OV) is a promising method of inhibiting tumor growth. OV have both direct antitumor and indirect immunostimulatory effects. It is known that in cancer pathologies, the recognition of a tumor antigen by cells of the immune system is impaired. Stimulation of dendritic cells (DC) under the action of tumor antigens together with viruses may enhance the generation of antigen-specific lymphocytes against tumor cells, which, in turn, can be an effective tool of antitumor cell technologies. The aim of the research was to study the possibility of using reovirus strain P-92 for the generation of tumor-specific T-lymphocytes *in vitro*. Our work has shown that the presence of reovirus P-92 with DC differentiation increases the yield of mature DCs. In addition, sample loading DCs with HeLa antigen after co-culture with lymphocytes and HeLa, showed no active cytolytic action, only a cytotoxic effect was observed, in contrast to the samples with the addition of reovirus P-92. Thus, an antigen, which is a HeLa cell culture incubated with reovirus P-92 under the conditions described above, can be proposed as an effective experimental product for the cellular immunotherapy of tumors.

Keywords: oncolytic viruses, biotherapy, reovirus P-92, dendritic cells, antigen-specific lymphocytes