

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-47-56>

Действие штамма Р-92 реовируса человека на опухолевые клеточные линии

С.Ю. Филиппова¹, А.О. Ситковская¹, И.В. Межевова¹, Е.Ю. Златник¹, И.А. Новикова¹,
Л.Ю. Владимирова¹, Ю.В. Пржедецкий¹, Е.А. Дженкова¹, С.А. Колпаков², Е.П. Колпакова²,
Е.Ю. Кириченко³, А.К. Логвинов⁴

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63;

²ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора; Россия, 344000 Ростов-на-Дону, пер. Газетный, 119;

³ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет»; Россия, 344000 Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1;

⁴ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»; Россия, 344006 Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42

Контакты: Ирина Валентиновна Межевова mezhevova88@gmail.com

Введение. Среди всех новых методов и подходов высокую эффективность в различных фазах клинических испытаний и хорошую переносимость пациентами показывает виротерапия онколитическими вирусами как в сочетании с иммунотерапией, так и без нее.

Цель – исследовать чувствительность некоторых иммортализованных клеточных линий рака к штамму Р-92 реовируса человека с характеристикой клеток на ультраструктурном уровне.

Материалы и методы. Исследование проводили на клеточных линиях HeLa, A549 и U87MG. Клетки высаживали по 15 тыс. на лунку 96-луночного планшета и после адгезии проводили инокуляцию вируса внесением среды, содержащей частицы вируса в четырех 10-кратных разведениях (примерно 10^9 – 10^6 частиц на 1 мл), культивировали 24 ч. После чего определяли количество живых клеток в лунках непрямым способом с применением метилтетразолиевого теста. Для изучения ультраструктуры зараженных вирусом клеток культуры высевали во флакон T25, проводили инокуляцию вирусом в максимальной концентрации. Спустя 24 ч культивирования клетки фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере в течение 1 ч, после чего трижды отмывали в фосфатном буфере и проводили образцы для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) по стандартной методике.

Результаты. Разведение вируса в 1000 раз приводило к снижению цитостатического эффекта во всех 3 культурах до уровня, практически не отличающегося от контроля. Наиболее чувствительной к реовирусу культурой оказалась HeLa. В эксперименте количество живых клеток сократилось до $60,4 \pm 10,2$ % по сравнению с контролем при инкубации с максимальным количеством вирусных частиц и до $63,7 \pm 16,2$ % – при 10-кратном разведении вируса. Данный показатель был достоверно ниже, чем в 2 других исследуемых культурах при данных условиях культивирования ($p < 0,001$). Кроме того, при максимальной концентрации вируса культура A549 оказалась менее чувствительной, чем культура U87MG ($p < 0,01$). При меньших концентрациях вирусных частиц значения средней жизнеспособности исследуемых клеточных линий достоверно не различались между собой. Анализ электронограмм показал, что вирус успешно реплицируется в цитоплазме исследуемых культур, однако не выделяется из клетки, что связано, видимо, с коротким периодом инкубации. На ТЭМ также были видны повреждения клеток, характерные для апо- или некроптоза, однотипно выраженные во всех исследованных культурах.

Заключение. Клеточные линии A549, HeLa и U87MG по результатам метилтетразолиевого теста демонстрируют разную чувствительность к штамму реовируса человека Р-92. Картина ТЭМ клеток зараженных культур продемонстрировала признаки развития апо- или некроптоза.

Ключевые слова: виротерапия, онколитические вирусы, реовирус, клеточная линия

Для цитирования: Филиппова С.Ю., Ситковская А.О., Межевова И.В. и др. Действие штамма Р-92 реовируса человека на опухолевые клеточные линии. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):47–56.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-47-56>

Effect of human reovirus strain R-92 on tumor cell lines

Svetlana Yu. Filippova¹, Anastasiya O. Sitkovskaya¹, Irina V. Mezhevova¹, Elena Yu. Zlatnik¹, Inna A. Novikova¹, Lubov Yu. Vladimirova¹, Yuri V. Przhedetskiy¹, Elena A. Dzhenkova¹, Sergey A. Kolpakov², Elena P. Kolpakova², Evgeniya Yu. Kirichenko³, Alexander K. Logvinov⁴

¹National Medical Research Centre for Oncology; 63 14th line St., Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rospotrebnadzor; 119 Gazetnij Pereulok, Rostov-on-Don 344000, Russia;

³Donskoy State Technical University; 1 Gagarin Square, Rostov-on-Don 344000, Russia;

⁴Southern Federal University; 105/42 B. Sadovaya St., Rostov-on-Don 344006, Russia

Contacts: Irina Valentinovna Mezhevova mezhevova88@gmail.com

Background. Among all the new methods and approaches, virotherapy with oncolytic viruses, both in combination with immunotherapy and without it, shows high efficiency in various phases of clinical trials and good tolerance by patients.

Aim. To study the sensitivity of some immortalized cancer cell lines to the R-92 strain of human reovirus with cell characteristics at the ultrastructural level.

Materials and methods. The study was carried out on cell lines of HeLa, A549, U87MG. Cells were planted in an amount of 15 thousand per well of a 96-well plate and after adhesion, the virus was inoculated by adding a medium containing virus particles in 4 tenfold dilutions (approximately 10^9 – 10^6 particles per ml). Next, the cells were cultured for 24 h, after which the number of living cells in the wells was determined indirectly using the methyl tetrazolium test, which was carried out according to standard methods. To study the ultrastructure of infected cells, cells were seeded into a T25 flask and inoculated with the virus at the maximum concentration. After 24 h of cultivation, the cells were fixed in a 2.5 % glutaraldehyde solution in phosphate buffer for 1 h, after which they were washed three times in phosphate buffer and samples were processed for TEM according to standard methods.

Results. Diluting the virus 1000 times led to a decrease in the cytostatic effect in all three cultures to a level practically no different from the control. HeLa turned out to be the most sensitive culture to reovirus. In the experiment, the number of living cells decreased to 60.4 ± 10.2 % compared to the control during incubation with the maximum number of viral particles and to 63.7 ± 16.2 % with a tenfold dilution of the virus. This indicator was significantly lower than in the other two studied cultures under these cultivation conditions ($p < 0.001$). In addition, at the maximum virus concentration, the A549 culture was less sensitive than the U87MG culture ($p < 0.01$). At lower concentrations of viral particles, the average viability of the studied cell lines did not differ significantly from each other. Analysis of electron diffraction patterns showed that the virus successfully replicates in the cytoplasm of the studied cultures, but is not released from the cell, which is apparently due to the short incubation period. TEM also showed cell damage characteristic of apoptosis or necroptosis, uniformly expressed in all studied cultures.

Conclusion. Cell lines A549, HeLa and U87MG, according to the results of the methyl tetrazolium test, demonstrate different sensitivity to the human reovirus strain P-92. The TEM picture of cells from infected cultures showed signs of the development of apoptosis or necroptosis.

Keywords: virotherapy, oncolytic viruses, reovirus, cell line

For citation: Filippova S.Yu., Sitkovskaya A.O., Mezhevova I.V. et al. Effect of human reovirus strain R-92 on tumor cell lines. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):47–56.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-47-56>

Введение

Одной из причин высокой смертности населения после сердечно-сосудистых заболеваний, как в России, так и в мире, являются онкологические заболевания. В нашей стране, несмотря на весь достигнутый прогресс, в профилактических и диагностических мероприятиях выявляется около полумиллиона злокачественных новообразований в год [1]. В борьбе с онкопатологией медицинскими работниками используется весь арсенал традиционных методов лечения рака (хирургическое лечение, лучевая терапия, химио-, иммуно- и таргетная терапия), и у большинства пациентов возникает стойкий ответ на лечение. Однако недостатком таких лечебных мероприятий

являются серьезные побочные эффекты, и часто возникает вопрос переносимости терапии пациентами [2]. В последние десятилетия исследователи активно борются с этими недостатками и разрабатывают новые подходы к лечению и снижению побочных эффектов у больных, проходящих тот или иной вид медицинского вмешательства.

Терапия онколитическими вирусами (ОЛВ) является перспективным направлением и активно изучается исследователями разных стран уже много лет. В 2004 г. в Латвии был одобрен 1-й препарат на основе энтеровируса группы ECHO Rignvir для лечения меланомы, за ним последовал Oncorine для лечения рака головы и шеи. Одним из первых препаратов

на основе ОЛВ, который был одобрен для лечения меланомы в США, а затем в Европейском Союзе, стал Talimogene laherparepvec, известный под коммерческим названием Imlygic, полученный на основе вируса простого герпеса 1 [3]. Известно также о клинических исследованиях препарата Реха-Vec (JX-594) на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины. В исследовании NCT02562755 проверяется эффективность Реха-Vec против гепатоцеллюлярной карциномы в сочетании с софатинибом, а в NCT02630368 — в сочетании с циклофосфамидом для лечения саркомы мягких тканей и распространенного рака молочной железы. В России также ведутся разработки в области виротерапии. В частности, доклинические исследования прошел препарат Канцеролизин, разработанный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» на основе аденовируса 5-го серотипа [4]. В экспериментах на клеточных культурах и лабораторных животных проводятся исследования противоопухолевой активности энтеровирусов [5], рекомбинантного парвовируса и вируса осповакцины [6] и других вирусов, однако до клинических исследований эти разработки еще не доведены.

Противоопухолевую активность ОЛВ проявляют 2 путями: лизисом клеток опухоли (онколиз) или стимулированием клеток иммунной системы. После проникновения вируса в клетку ОЛВ самореплицируются, вирусные копии проникают далее в окружающие опухолевые клетки, что приводит к разрушению большей части опухолевого очага. Из-за опухолеспецифических особенностей клеток рака или генетических модификаций вируса некоторые ОЛВ избирательно реплицируются только в клетках опухоли и не проявляют цитотоксичности к здоровым клеткам, как было показано, в том числе и в наших работах [7]; также ОЛВ активируют врожденную и адаптивную иммунную систему, вызывая иммуногенную гибель опухолевых клеток [3]. Вирусы, используемые в настоящее время в качестве онколитических агентов, включают рео-, аденовирусы, вирус простого герпеса, вирус Коксаки, вирус коровьей оспы, вирус кори и вирус болезни Ньюкасла [8]. Реовирус млекопитающих (*Orthoreovirus*) является одним из 9 родов семейства *Reoviridae* и обладает наиболее широким кругом хозяев среди представителей данного семейства. Название «реовирус» произошло от аббревиатуры «рео» (respiratory enteric orphan — reo) в связи с тем, что он обычно выделяется из дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта человека; инфекция, как правило, имеет доброкачественное течение. Реовирус является одним из нескольких встречающихся в природе вирусов, которые, как было показано в ранних клинических исследованиях, обладают онколитическим потенциалом в отношении ряда трансформированных клеточных линий человека, клеточных линий рака и опухолевой ткани *ex vivo*.

Реовирус, так же, как и другие ОЛВ, инфицирует опухолевые клетки и разрушает их путем прямого онколиза, активирует противоопухолевый ответ Т-клеток, действуя таким образом и на метастазы [9]. Избирательная репликация вирусов в клетках опухоли и их лизис приводит к высвобождению растворимых антигенов (АГ), цитокинов, таких как интерфероны типа I (ИФН- γ) и фактор некроза опухоли α (ФНО- α). Эти цитокины управляют противоопухолевым иммунитетом, индуцируя созревание антигенпрезентирующих клеток, которые, в свою очередь, активируют клетки — натуральные киллеры, CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки, способствуя регрессии опухоли даже в местах, удаленных от первичного очага [3]. Таким образом, кроме непосредственного онколитического действия, перспективным направлением использования реовирусов для лечения опухолей может быть повышение эффективности противоопухолевых дендритно-клеточных (ДК) вакцин. Ранее мы уже исследовали возможность применения штамма реовируса Р-92, выделенного в ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора [10], в качестве адъюванта для получения ДК-вакцин. Данный штамм реовируса, выделенный в 1992 г., является непатогенным, депонирован в коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (номер ГКВ № 2363). Штамм Р-92 охарактеризован электронно-микроскопическими, серологическими методами и полимеразной цепной реакцией как относящийся предположительно к 3-му серотипу реовируса [10]. Мы обнаружили, что добавление данного штамма к культуре HeLa в качестве АГ способствует активации и созреванию ДК, а также снижению доли иммуносупрессивных Т-регуляторных клеток при сокультивировании полученных ДК с лимфоцитами. Кроме того, под действием реовируса наблюдается усиление цитолитической активности активированных таким образом лимфоцитов в отношении клеток HeLa [11, 12]. Наблюдаемый эффект может быть использован для совершенствования процесса получения ДК, что требует более детальных исследований лежащих в его основе молекулярных механизмов. Мы также установили, что данный штамм реовируса проявляет цитолитическую активность в отношении культур HeLa, рака молочной железы BT-20, рака предстательной железы PC3, колоректального рака HT29 и немелкоклеточного рака легкого A549 [13]. Признаки цитопатического действия вируса в виде ошаривания клеток и разрушения монослоя наблюдали уже через 24 ч после инокуляции, однако степень выраженности эффекта различалась между культурами. Через 48 ч в среде культивирования определяли большое количество вирусных частиц, что позволило предположить: наблюдаемый цитопатический эффект

связан с вызванным размножением вируса лизисом клеток.

В настоящем исследовании мы расширили круг тестируемых клеточных линий рака и провели количественное измерение их чувствительности к штамму Р-92 реовируса человека. Определили наиболее чувствительную клеточную линию и оптимальную дозу вирусных частиц для дальнейших молекулярно-генетических исследований и изучения возможности более широкого применения реовируса в качестве противоопухолевого агента и перспективного адъюванта для получения ДК вакцин. Мы выбрали экспозицию 24 ч, так как именно в этом промежутке времени наблюдаются наибольшие различия в цитопатическом эффекте между культурами. Кроме того, для изучения связи между размножением вируса и гибелью клеток в культуре при данной экспозиции мы охарактеризовали ультраструктурное строение зараженных клеток методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

Материалы и методы

Клеточные культуры рака шейки матки HeLa, аденокарциномы легкого A549 и глиобластомы U87MG культивировали в полной питательной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10 % фетальную бычью сыворотку (Hyclone, США), 1 % незаменимых аминокислот (Gibco, США), 1 % L-глутамин (Gibco, США), 1 % пенициллин-стрептомицина («Биолот», Россия), во влажной атмосфере при 37 °C, 5 % CO₂. Каждую культуру высевали в 96-луночный плоскостонный планшет в количестве 15 тыс. клеток на лунку. После адгезии клеток среду отбирали и вносили 10 мкл среды с реовирусом человека штамм Р-92 (в среде без добавления сыворотки) в четырех 10-кратных разведениях, начиная от максимальной концентрации, равной примерно 10⁹ действующих частиц на 1 мл. Данная концентрация была предварительно подсчитана на культуре почки эмбриона свиньи перед помещением образцов вируса на хранение в ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора [10]. Контроль – клетки без вируса. Клетки выдерживали 1 ч для адгезии вирусных частиц на клеточных мембранах и довели объем среды в лунках до 100 мкл. Затем клетки культивировали в течение 24 ч, после чего определяли количество живых клеток в лунках непрямым способом с применением метилтетразолиевого теста, который проводили по стандартной методике [14]. Жизнеспособность определяли по следующей формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = 100 \times (\text{ОП}_0 / \text{ОП}_k),$$

где ОП₀, ОП_к – оптическая плотность при 540 нм в опытных и контрольных лунках соответственно.

Каждый вариант опыта поставили в 15 повторах. Всего эксперимент провели 3 раза. Статистическая обработка включала вычисление средних значений жизнеспособности и стандартных отклонений от среднего. Сравнение средних значений проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента. В исследовании принят уровень значимости α , равный 0,01.

Для исследования при помощи ТЭМ культуры высевали на флаконе Т25, после адгезии проводили заражение вирусом в максимальной концентрации в 500 мкл среды без добавления сыворотки в течение 1 ч, далее довели объем среды с сывороткой до 3 мл и инкубировали еще 24 ч. По окончании инкубации клетки снимали с флакона при помощи скребка, затем центрифугировали 5 мин при относительном центробежном ускорении 300 g и фиксировали осадок в 2,5 % растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере. Клетки выдерживали в растворе фиксатора в течение 1 ч, после чего трижды отмывали в фосфатном буфере и проводили образцы для ТЭМ по стандартной методике [15]. Изображения ультратонких срезов получали на электронном микроскопе Jem 1011 (Jeol, Япония).

Результаты и обсуждение

Реакция тестируемых культур спустя 24 ч культивирования зависела от дозы вируса. Разведение вируса в 1000 раз приводило к снижению цитостатического эффекта во всех 3 культурах до уровня, практически не отличающегося от контроля (табл. 1). При высоких вирусных нагрузках исследуемые культуры показали разную чувствительность к штамму реовируса Р-92. Наиболее чувствительной при максимальной концентрации вирусных частиц оказалась культура HeLa, в которой количество живых клеток сократилось до $60,4 \pm 10,2$ % по сравнению с контролем без добавления вируса. При этом разница средних значений жизнеспособности оказалась достоверной как с показателем культуры A549 ($81,02 \pm 7,8$ %; $p < 0,001$), так с показателем культуры U87MG ($72,9 \pm 5,2$ %; $p < 0,001$). При 10-кратном разведении вируса культура HeLa также показала наименьшую жизнеспособность ($63,7 \pm 16,2$ %), что было достоверно ниже, чем в культурах A549 ($78,6 \pm 10,7$ %; $p < 0,01$) и U87MG ($78,8 \pm 9,6$ %; $p < 0,01$). Кроме того, при максимальной концентрации вируса культура A549 оказалась менее чувствительной, чем культура U87MG ($p < 0,01$). При разведениях вирусных частиц в 100 и 1000 раз средние значения жизнеспособности исследуемых клеточных линий достоверно не различались между собой.

Тот факт, что цитостатический эффект от добавления вируса оказался пропорционален его концентрации, говорит об отсутствии при данных условиях эксперимента значимого вторичного заражения

Таблица 1. Значения жизнеспособности клеток тестируемых культур при культивировании в течение 24 ч после инокуляции штаммом реовируса P-92

Table 1. Cell integrity values of the tested cultures when cultivated for 24 h after inoculation with the reovirus strain P-92

Культура Cell line	Кратность разведения вируса, % Virus dilution factor, %			
	1	10	100	1000
HeLa	60,4 ± 10,2	63,7 ± 16,2	91,61 ± 18,5	93,71 ± 10,7
A549	81,02 ± 7,8	78,6 ± 10,7	87,79 ± 11,8	94,76 ± 10,2
U87MG	72,9 ± 5,2	78,8 ± 9,6	89,78 ± 7,5	99,1 ± 5,4

клеток. При вторичном заражении, размножившись в 1 клетке, вирусные частицы выходят из нее и заражают другие клетки, вызывая лавинообразное нарастание количества погибших клеток, деструкцию монослоя и разрушение клеток культуры в лунке целиком даже при небольшой изначальной концентрации вируса в среде, чего в нашем эксперименте не наблюдалось. Вероятно, выявленная нами цитостатическая активность вируса в большей степени связана с реакцией внутриклеточных защитных механизмов на попадание в цитоплазму большого количества вирусных частиц. Тем не менее гипотеза об отсутствии вторичного заражения требует подтверждения в экспериментах с титрованием вирусных частиц из супернатанта зараженных культур. Помимо иммунного ответа на вирусы, развивающегося в условиях целостного организма и включающего активацию различных звеньев иммунной системы, не относящиеся к ней клетки, в том числе культивируемые, тоже имеют противовирусную защиту. Эта защита проявляется в виде активации ряда внутриклеточных сигнальных каскадов, приводящих к апоптозу в ответ на вирусное заражение. Известно, что распознавание геномной двуцепочечной РНК реовируса приводит к индукции синтеза ИФН I типа [9]. Описана ИФН-зависимая активация участвующих в программируемой клеточной гибели генов *ISG54* (*IFIT2*) и *ISG12b2* [16]. Кроме того, имеются данные о существовании не связанных с ИФН I типа событиях, приводящих к клеточной гибели на ранних стадиях заражения клетки, например о непосредственном встраивании высвобождающегося из вирусных частиц при входе в клетку вирусного белка $\mu 1$ в митохондриальные мембраны, что приводит к их дестабилизации и выходу в цитоплазму проапоптотических белков цитохрома C и SMAC/DIABLO, которые далее активируют каспазу-9 и осуществляют апоптоз [17]. Наблюдаемую у культуры A549 относительно более высокую, чем у культур HeLa и U87MG, устойчивость к цитостатическому действию вируса можно объяснить дефицитом одного из описанных ранее механизмов или различной тропностью вируса

к ним. Известно, что в некоторых культурах рака молочной железы прочность взаимодействия вируса с сialовыми кислотами, являющимися рецепторами для реовирусов, снижается из-за наличия протеолитических ферментов, разрушающих белки капсида [18]. Кроме того, снижение количества сialовых кислот на клеточных мембранах способно снижать способность вирусов к заражению клеток само по себе.

Таким образом, результаты теста на цитотоксическое действие вируса не дали однозначного ответа на вопрос о том, способен ли тестируемый штамм реовируса размножаться в клетках исследуемых культур, поэтому мы дополнительно исследовали ультраструктуру зараженных клеток с помощью ТЭМ. Результаты исследования показали, что в цитоплазме клеток всех 3 культур наблюдаются типичные признаки размножения вируса. Так, в культуре HeLa, показавшей наибольшую чувствительность к вирусу, практически во всех клетках на препаратах для ТЭМ в области цитоплазмы, окружающей ядро клетки, обнаруживали обширные области так называемых вирусных фабрик, или вироплазм (рис. 1, а, б), типичных по своему строению для реовирусов [19]. В наименее чувствительной культуре A549 наблюдали только небольшие скопления в единичных клетках (см. рис. 1, в, г), в то время как в культуре U87MG, демонстрирующей среднюю чувствительность к вирусу, обнаруживали обширные области вироплазмы (см. рис. 1, д, е). Вирусные фабрики реовирусов представляют собой не окруженные мембраной электронно-плотные компартменты цитоплазмы, в которых происходит сборка вирусных частиц из синтезируемых здесь же молекул вирусных белков и РНК [20]. Такие структуры служат для защиты белков и нуклеиновых кислот вируса от клеточных ферментов и взаимодействия с интерферирующими РНК. Известно, что изначально небольшие островки вирусных фабрик реовирусов формируются ближе к клеточной мембране, где начинается синтез вирусных РНК и белков сразу после проникновения вируса в клетку, позже отдельные островки двигаются к ядру, где сливаются в крупные облака, в которых начинают

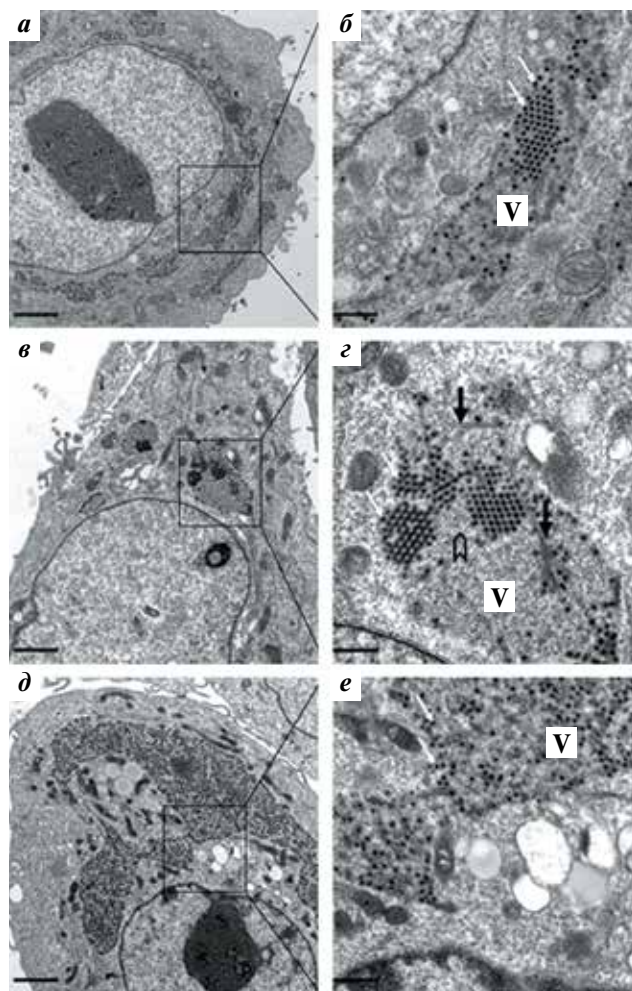


Рис. 1. Реовирус Р-92 в клетках исследуемых клеточных линий: а, б – культура HeLa; в, з – культура А549; д, е – культура U87MG. Размерная шкала, мкм: а, в, д – 2; б, з, е – 0,5. Обозначения: V – вироплазма; белые стрелки – вирусные структуры; черные заполненные стрелки – микротрубочки; черные пустотелые стрелки – фрагменты эндоплазматического ретикулума

Fig. 1. Reovirus R-92 in cells of the studied cell lines: а, б – HeLa culture; в, з – culture A549; д, е – culture U87MG. Dimensional scale, μm : а, в, д – 2; б, з, е – 0.5. Designations: V – viroplasm; white arrows – viral structures; black filled arrows – microtubules; black hollow arrows – fragments of the endoplasmic reticulum

образовываться и скапливаться уже зрелые вирусные частицы [21]. Вирусные структуры на полученных нами электронограммах отчетливо видны как округлые тела примерно 70–80 нм в диаметре, которые включены в вироплазмы как поодиночке, так в составе упорядоченных скоплений, напоминающих пчелиные соты (см. рис. 1). Зрелые частицы имеют электронно-плотную сердцевину из-за присутствия в них конденсированных молекул РНК вируса, в то время как незрелые частицы выглядят пустыми. Некоторые авторы предполагают, что по соотношению зрелых и незрелых частиц можно судить о чувствительности культуры к вирусу [19].

Кроме того, в составе вирусных фабрик, обнаруженных нами в цитоплазме всех исследуемых культур, наблюдаются фрагменты эндоплазматического ретикулума и микротрубочки (см. рис. 1, б, з, е). Согласно данным литературы, эти элементы цитоплазмы рекрутируются вирусом для сборки своих частиц [19, 22], при этом вирус использует внутренний сигнальный аппарат клетки для управления процессами перестройки эндоплазматического ретикулума, липосом и микротрубочек [21, 23].

Таким образом, штамм реовируса человека Р-92 успешно реплицируется в испытанных культурах, образуя типичные для данного рода вирусов структуры. На электронограммах не наблюдали признаков передвижения частиц вируса к плазмалемме или присутствия большого количества вирусов в межклеточном пространстве. Можно предположить, что везикулы с вирусами и отдельные вирусные частицы были утрачены во время подготовки препарата для ТЭМ, однако в препаратах все же встречаются многочисленные экстраклеточные везикулы, в которых тем не менее не содержатся вирусы (рис. 2, а). Помимо этого, очень редко встречаются отдельные частицы вируса вблизи плазмалеммы, о которых нельзя сказать, выделились ли они из зараженных клеток или остались на мембране после первичной инокуляции культуры (рис. 2, з). Следовательно, можно предположить, что на данной стадии заражения, а именно спустя 24 ч после инокуляции, вирус активно размножается в клетках культур HeLa и U87MG и в меньшей степени – А549, однако еще не покидает клетки.

Нужно отметить, что процесс выделения частиц реовируса из зараженных клеток остается малоизученным, большинство ученых сходятся во мнении о том, что выделение вируса не управляется какими-то специфическими сигнальными событиями, а происходит вместе с лизисом клеток [21]. Лизис клеток наступает вследствие апоптоза, запускаемого внешними сигналами через рецепторы смерти ФНО-R1, DR4/DR5 и Fas и соответствующими лигандами ФНО, TRAIL и FasL, взаимодействие которых способствует запуску реовирус-опосредованной каспазо-8-зависимой активации апоптоза. Кроме того, большое значение в связанной с размножением вируса смерти клеток играют внутренние сигналы, такие как классический митохондриальный путь апоптоза, который активируется во время инфекции посредством индуцированного клеточным стрессом расщепления белка Bid и следующей за этим активацией белка Bax, приводящей к нарушению структуры мембран митохондрий и высвобождению из них цитохрома С, способствующего активации каспазы 3 и клеточной гибели [17].

В зараженных культурах встречались ультраструктурные признаки клеточного стресса и контролируемой

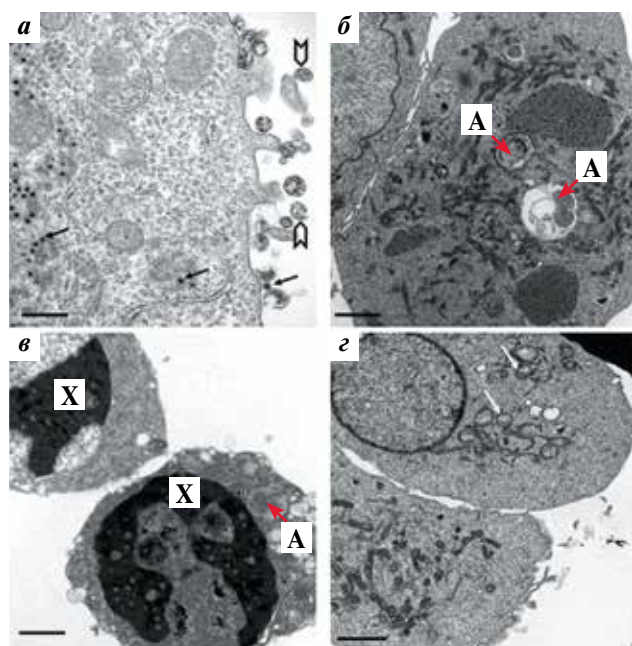


Рис. 2. Ультраструктурные характеристики клеток, зараженных реовирусом Р-92: а — выделение вирусных частиц из клетки, экзосомы в клетках культуры HeLa; б — аутофагосомы при ненарушенной структуре митохондрий в клетках культуры U87MG, характерные для ранней стадии апоптоза; в — конденсация цитоплазмы и ядра, конденсация хроматина в чашевидные образования, аутофагосомы в культуре HeLa, характерные для поздней стадии апоптоза; г — потеря микровыростов мембраны, набухание митохондрий в клетках культуры U87MG, характерные для некроптоза. Размерная шкала, мкм: а — 0,5; б, г — 2; в — 1. Обозначения: А — аутофагосома; X — конденсированный хроматин; белые стрелки — набухшие митохондрии; черные стрелки — частицы вируса; черные пустотелые стрелки — экзосомы

Fig. 2. Ultrastructural characteristics of cells infected with reovirus R-92: а — isolation of viral particles from cells, exosomes in HeLa culture cells; б — autophagosomes with undisturbed mitochondrial structure in U87MG culture cells, characteristic of the early stage of apoptosis; в — condensation of the cytoplasm and nucleus, condensation of chromatin into cup-shaped formations, autophagosomes in HeLa culture, characteristic of the late stage of apoptosis; г — loss of membrane microgrowths, swelling of mitochondria in U87MG culture cells, characteristic of necroptosis. Size scale, μm : а — 0.5; б, г — 2; в — 1. Designations: А — autophagosome; X — condensed chromatin; white arrows — swollen mitochondria; black arrows — virus particles; black hollow arrows — exosomes

гибели. Чаще всего мы наблюдали признаки раннего апоптоза, а именно присутствие в цитоплазме аутофагосом при ненарушенной структуре митохондрий (рис. 2, б) [24]. Более поздние стадии апоптоза наблюдали в культуре HeLa и единичных клетках 2 других исследованных культур: на электронограммах хорошо видны конденсация цитоплазмы и ядра, а также конденсация хроматина в чашевидные образования и формирование множественных аутофагосом, что характеризует данный тип запрограммированной клеточной гибели (рис. 2, в). Кроме того, в некоторых клетках культуры U87MG можно отметить признаки раннего некроптоза, такие как набухание мембраны и потеря микровыростов, как на

рис. 2 г, где рядом видны 2 клетки — с выростами и без таковых. При этом в клетке без микровыростов также наблюдается еще 1 признак раннего некроптоза — набухание митохондрий [24].

Ранее мы показали, что зараженные вирусом клетки культуры HeLa оказались более эффективными в качестве источника АГ для стимуляции ДК и последующего нацеливания и активации Т-клеток, чем лизат клеток этой же культуры, полученный традиционным методом многократного замораживания и оттаивания [11, 12]. С одной стороны, такое усиление активации ДК объясняется возможным увеличением продукции зараженными клетками HeLa таких цитокинов, как ИФН- γ и ФНО- α , управляющих созреванием ДК. Известно, что продукция этих и других цитокинов не является прерогативой иммунокомпетентных клеток, но может осуществляться и опухолевыми. С другой стороны, данный феномен объясняется высвобождением из зараженных клеток молекулярных фрагментов, ассоциированных с патогенами (PAMPs), и молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением/опасностью (DAMPs). Природа взаимодействия этих сигналов с клеточными рецепторами ДК определяет генерацию костимулирующих молекул, таких как CD80, CD86, на ДК, взаимодействующих с CD28 на Т-клетках, и воспалительных цитокинов, которые стимулируют и поддерживают экспансию и дифференцировку Т-клеток. Без согласованного совместного действия этих факторов вместо активации Т-клеток может развиться их анергия или иммунная толерантность. Более того, определенные PAMPs/DAMPs могут индуцировать продукцию различных цитокинов, приводя к поляризации ответа по пути активации Th1 или Th2 [25]. Известно, что состав DAMPs во многом зависит от типа клеточной гибели и причины, ее вызвавшей. Некроз, вызванный замораживанием и оттаиванием клеток, приводит к высвобождению большого количества DAMPs (внеклеточные кальретикулин, аденозинтрифосфорная кислота, амфотерин и др.) [26], однако наши предыдущие данные свидетельствуют о том, что полученный таким способом клеточный лизат значительно проигрывает по способности активировать ДК как зараженным реовирусом клеткам, так и самому вирусу. При этом, несмотря на то что реовирус активировал ДК, как и вирусный лизат, именно последний вариант вызывал более эффективную активацию CD8⁺-Т-лимфоцитов при их сокультивировании с ДК. Специфическая активность лизата из зараженных клеток HeLa может быть связана с процессами контролируемой клеточной гибели, которые мы наблюдали на ультраструктурном уровне — апо- и некроптозом. По некоторым данным литературы, именно контролируемая клеточная гибель под действием ОЛВ, сопровождающаяся выделением

в среду аденозинтрифосфорной кислоты, кальретикулина и амфотерина, является более иммуногенным ее вариантом [3].

По-видимому, присутствие реовируса в таком лизате оказывает адъювантный эффект вследствие его способности активировать ДК и усиливать цитотоксическую активность Т-клеток после сокультивирования с этими ДК за счет таких RAMPs, как двуцепочечная РНК вируса [6].

Заключение

Иммортализованные культуры злокачественных клеток по результатам метилтетразолиевого теста демонстрируют разную чувствительность к штамму реовируса человека Р-92 при экспозиции 24 ч. Сокращение

концентрации вирусных частиц до 10^6 частиц в 1 мл раствора для инокуляции практически полностью нивелировало цитостатические свойства вируса. Картина ТЭМ клеток зараженных культур продемонстрировала признаки развития апо- или некроптоза. Кроме того, во всех культурах показано размножение вирусных частиц. Мы предполагаем, что в первые 24 ч после инокуляции цитопатические свойства вируса в культурах A549, HeLa и U87MG в большей степени обусловлены работой клеточных механизмов противовирусной защиты или прямым повреждением клеточных структур белками вируса при высокой вирусной нагрузке, чем процессами, связанными с размножением вируса в клетке. Данное предположение нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с. State of oncological care to the population of Russia in 2021. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2022. 239 p. (In Russ.).
2. Тимошкина Н.Н., Богомолова О.А., Жужеленко И.А. и др. Исследование полиморфизмов генов *UGT1A1* и *DPYD* у пациентов с колоректальным раком. Сибирский онкологический журнал 2018;17(6):49–56. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-49-56
Timoshkina N.N., Bogomolova O.A., Zhuzhelenko I.A. et al. Study of polymorphisms of the *UGT1A1* and *DPYD* genes in patients with colorectal cancer. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal* = *Siberian Journal of Oncology* 2018;17(6):49–56. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-49-56
3. Lin D., Shen Y., Liang T. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):156. DOI: 10.1038/s41392-023-01407-6
4. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А. и др. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата канцеролизин. Вопросы вирусологии 2006;51(6):39–42. PMID: 17214082
Vdovichenko G.V., Petrischenko V.A., Sergeev A.A. et al. Preclinical studies of the anticancer therapeutic adenoviral drug carcinoлизин. *Voprosy virusologii* = *Virology Issues* 2006;51(6):39–42. (In Russ.). PMID: 17214082
5. Желтухин А.О., Соболева А.В., Сосновцева А.О. и др. Энтеровирусы человека проявляют избирательную онколитическую активность на модели ксенотрансплантатов мультиформной глиобластомы человека в иммунодефицитных мышах. Вестник РГМУ 2018;(2):45–51. DOI: 10.24075/vrgmu.2018.026
Zheltukhin A.O., Soboleva A.V., Sosnovtseva A.O. et al. Human enteroviruses exhibit selective oncolytic activity in xenograft models of human glioblastoma multiforme in immunodeficient mice. *Vestnik RGMU* = *Bulletin of RGMU* 2018;(2):45–51. (In Russ.). DOI: 10.24075/vrgmu.2018.026
6. Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А. и др. Таргетная терапия глиобластомы человека с использованием онколитического потенциала парвовируса и аттенуированных штаммов вируса осповакцины. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2019;37(2):83–91. DOI: 10.17116/molgen20193702183
Tkacheva A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A. et al. Targeted therapy of human glioblastoma using the oncolytic potential of parvovirus and attenuated strains of the vaccinia virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya* = *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2019;37(2):83–91. (In Russ.). DOI: 10.17116/molgen20193702183
7. Кит О.И., Филиппова С.Ю., Тимофеева С.В. и др. Влияние онколитических штаммов новой неклассифицированной группы ротавирусов человека на лимфоциты периферической крови. Южно-Российский онкологический журнал 2021;2(3):23–30. DOI: 10.37748/2686-9039-2021-2-3-3
Kit O.I., Filippova S.Yu., Timofeeva S.V. et al. Effect of oncolytic strains of a new unclassified group of human rotaviruses on peripheral blood lymphocytes. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal* = *South Russian Journal of Cancer* 2021;2(3):23–30. (In Russ.). DOI: 10.37748/2686-9039-2021-2-3-3
8. 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):105–13. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-105-113
Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Kit O.I. Newcastle disease virus – effective alliance in the fight against cancer. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal* = *Siberian Journal of Oncology* 2018;17(6):105–13. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-105-113
9. Müller L., Berkeley R., Barr T. et al. Past, present and future of oncolytic reovirus. *Cancers (Basel)* 2020;12(11):3219. DOI: 10.3390/cancers12113219
10. Колпаков С.А. Новые эритроцитарные тест-системы для выявления вирусов различных антигенных групп, разработанные в Ростовском НИИ: опыт использования и дальнейшие перспективы. В кн.: Профилактика инфекционных заболеваний на рубеже XXI века: сб. науч. тр. Хабаровск, 2001. С. 305–12.
Kolpakov S.A. New erythrocyte test systems for identifying viruses of various antigenic groups, developed at the Rostov Research Institute: experience of use and future prospects.

- In: Prevention of infectious diseases at the turn of the 21st century: Sat. scientific tr. Khabarovsk, 2001. P. 305–12. (In Russ.).
11. Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Межевова И.В. и др. Влияние онколитического реовируса Р-92 на созревание дендритных клеток и генерацию опухолеспецифических Т-лимфоцитов *in vitro*. Цитология 2019;61(7):529–35. DOI: 10.1134/S0041377119070095
Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Mezheva I.V. et al. The *in vitro* effect of oncolytic reovirus P-92 on dendritic cells maturation and the generation of tumor-specific T-lymphocytes. Tsitologiya = Cytology 2019;61(7):529–35. DOI: 10.1134/S0041377119070095
 12. Кит О.И., Златник Е.Ю., Новикова И.А. и др. Способ стимуляции презентирющей активности дендритных клеток: патент № 2728592 C1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, A61K 31/00 от 30.07.2020.
Kit O.I., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A. et al. Method for stimulating the presenting activity of dendritic cells: Patent No. 2728592 C1 Russian Federation, IPC C12Q 1/68, A61K 31/00 from 30.07.2020. (In Russ.).
 13. Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Новикова И.А. и др. Исследование возможности онколитических эффектов *in vitro* вирусов из семейств *Reoviridae* и *Paramyxoviridae*. Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки 2018;4(200):124–30. DOI: 10.23683/0321-3005
Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A. et al. Study of the possibility of oncolytic effects *in vitro* of viruses from the families *Reoviridae* and *Paramyxoviridae*. Izvestiya vuzov. Severo-kavkazskiy region. Estestvennye nauki = News from universities. North Caucasus Region Natural Sciences 2018;4(200):124–30. (In Russ.). DOI: 10.23683/0321-3005
 14. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. Пер. с 5-го англ. изд.-я. М.: Бином; Лаборатория знаний, 2011.
Freshni R.Ya. Culture of animal cells. Practical management. Translation from the 5th English edition. Moscow: Binom; Laboratory of Knowledge, 2011. (In Russ.).
 15. Graham L., Orenstein J. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. Nat Protoc 2007;2(10):2439–50. DOI: 10.1038/nprot.2007.304
 16. Lu M., Liao F. Interferon-stimulated gene ISG12b2 is localized to the inner mitochondrial membrane and mediates virus-induced cell death. Cell Death Differ 2011;18(6):925–36. DOI: 10.1038/cdd.2010.160
 17. McNamara A., Roebke K., Danthi P. Cell killing by reovirus: mechanisms and consequences. Curr Top Microbiol Immunol 2023;442:133–53. DOI: 10.1007/82_2020_225
 18. Fernandes J.P., Cristi F., Eaton H.E. et al. Breast tumor-associated metalloproteases restrict reovirus oncolysis by cleaving the $\sigma 1$ cell attachment protein and can be overcome by mutation of $\sigma 1$. J Virol 2019;93(22):e01380–19. DOI: 10.1128/JVI.01380–19
 19. Fernández de Castro I., Risco C. Imaging RNA virus replication assemblies: Bunyaviruses and reoviruses. Fut Virol 2014;9(12):1089–104. DOI: 10.2217/fvl.14.95
 20. Fernández de Castro I., Zamora P.F., Ooms L. et al. Reovirus forms neo-organelles for progeny particle assembly within reorganized cell membranes. mBio 2014;5(1):e00931–13. DOI: 10.1128/mBio.00931–13
 21. Knier J., Dos Santos T., Eaton H.E. et al. Reovirus uses temporospatial compartmentalization to orchestrate core versus outercapsid assembly. PLoS Pathog 2022;18(9):e1010641. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010641
 22. Shah P.N.M., Stanifer M.L., Höhn K. et al. Genome packaging of reovirus is mediated by the scaffolding property of the microtubule network. Cell Microbiol 2017;19(12):10. DOI: 10.1111/cmi.12765
 23. Tenorio R., Fernández de Castro I., Knowlton J. et al. Reovirus σ NS and μ NS proteins remodel the endoplasmic reticulum to build replication neo-organelles. mBio 2018;9(4):e01253–18. DOI: 10.1128/mBio.01253–18
 24. Golla N., Hong L.J., Chefetz I. Visualization of necroptotic cell death through transmission electron microscopy. Methods Mol Biol 2021;2255:135–47. DOI: 10.1007/978-1-0716-1162-3_12
 25. Хаитов Р.М. Иммунология. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 496 с.
Khaitov R.M. Immunology. 3rd ed., reprint and add. Moscow: GEOTAR-Media, 2018. 496 p. (In Russ.).
 26. Galluzzi L., Vitale I., Warren S. et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. J Immunother Cancer 2020;8(1):e000337. DOI: 10.1136/jitc-2019-000337

Вклад авторов

С.Ю. Филиппова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание статьи;
А.О. Ситковская: разработка дизайна исследования, редактирование статьи;
И.В. Межевова: получение данных для анализа, редактирование статьи;
Е.Ю. Златник: разработка дизайна исследования, редактирование, анализ полученных данных;
И.А. Новикова, Л.Ю. Владимирова, Ю.В. Пржедецкий, Е.А. Дженкова: научное редактирование статьи;
С.А. Колпаков, Е.П. Колпакова: выделение, предоставление вирусов, научное редактирование статьи;
Е.Ю. Кириченко, А.К. Логвинов: электронная микроскопия, редактирование статьи.

Author's contributions

S.Yu. Filippova: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, article writing;
A.O. Sitkovskaya: research design development, editing of the article;
I.V. Mezheva: obtaining data for analysis, editing of the article;
E.Yu. Zlatnik: research design development; editing, analysis of the data obtained;
I.A. Novikova, L.Yu. Vladimirova, Yu.V. Przhedetskiy, E.A. Dzhenkova: scientific editing;
S.A. Kolpakov, E.P. Kolpakova: isolation, provision of viruses, scientific editing;
E.Yu. Kirichenko, A.K. Logvinov: electron microscopy, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.Ю. Филиппова / S.Yu. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>
А.О. Ситковская / A.O. Sitkovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>
И.В. Межевова / I.V. Mezhevoва: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>
Е.Ю. Златник / E.Yu. Zlatnik: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>
И.А. Новикова / I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>
Л.Ю. Владимирова / L.Yu. Vladimirova: <https://orcid.org/0000-0003-4236-6476>
Ю.В. Пржедецкий / Yu.V. Przhedetskiy: <https://orcid.org/0000-0003-3976-0210>
Е.А. Дженкова / E.A. Dzhenkova: <https://orcid.org/0000-0002-3561-098X>
Е.П. Колпакова / E.P. Kolpakova: <https://orcid.org/0000-0003-3528-785X>
Е.Ю. Кириченко / E.Yu. Kirichenko: <https://orcid.org/0000-0003-4703-1616>
А.К. Логвинов / A.K. Logvinov: <https://orcid.org/0000-0002-8873-3625>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 31.10.2023. Принята в печать: 13.05.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.0000.
Article received: 31.10.2023. Accepted for publication: 13.05.2024. Published online: 00.00.0000.