

## ВЛИЯНИЕ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА НА ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Златник Е.Ю.<sup>1</sup>, Ситковская А.О.<sup>1</sup>, Шульгина О.Г.<sup>1</sup>, Бондаренко Е.С.<sup>1</sup>, Золотарева Е.И.<sup>1</sup>, Гречкин Ф.Н.<sup>1</sup>, Харагезов Д.А.<sup>1</sup>, Каймакчи Д.О.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Проведено экспериментальное изучение влияния введения вакцинного штамма вируса болезни Ньюкасла на рост перевивной опухоли карциномы Герена, продолжительность жизни и показатели клеточного иммунитета крыс-опухоленосителей. Работа выполнена на 19 белых беспородных крысах-самцах с перевивной карциномой Герена. Вирус-вакцину вводили в разовой дозе 5000 прививных доз паратуморально 2 раза в неделю, всего 4 раза: 1-й группе крыс введение начинали через 1 день после перевивки опухоли, 2-й группе – за неделю до перевивки. В периферической крови, собранной из бедренной вены животных, определяли субпопуляционный состав лимфоцитов 2 раза в неделю в течение двух недель по окончании введения вируса 2-й группе. Относительное количество Т- и В-лимфоцитов исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Результаты позволили установить различия характера иммунологических изменений, развивающихся у крыс-опухоленосителей, в зависимости от времени введения вируса по отношению к моменту перевивки опухоли и их возможную значимость для получения профилактического эффекта на развитие перевивной опухоли у некоторых животных. Вирус болезни Ньюкасла в ранние сроки после введения вызывает выраженное повышение уровня Т-клеток с маркером ранней активации при снижении уровня CD3+CD8+ клеток у животных еще до перевивки им опухоли Герена, а после перевивки у них отмечались более высокие уровни CD3+CD4+ лимфоцитов по сравнению с другими группами. У контрольных животных во все сроки исследования наблюдалось наиболее высокое содержание CD3+CD8+ и наиболее низкое CD3+CD25+ клеток.

Ключевые слова: вирус болезни Ньюкасла, онколизис.

## EFFECT OF THE NEWCASTLE DISEASE VIRUS ON SOME INDICES OF CELL-MEDIATED IMMUNITY IN TUMOR-BEARING RATS (EXPERIMENTAL STUDY)

Zlatnik E.Yu.<sup>1</sup>, Sitkovskaya A.O.<sup>1</sup>, Shulgina O.G.<sup>1</sup>, Bondarenko E.S.<sup>1</sup>, Zolotareva E.I.<sup>1</sup>, Grechkin F.N.<sup>1</sup>, Kharagezov D.A.<sup>1</sup>, Kaymakchy D.O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

The use of oncolytic viruses for biotherapy of tumors is a promising approach. It is assumed that the introduction of viruses into the patient's body induces both a direct and indirect antitumor effect. Especially promising is the Newcastle disease virus. The work was performed on 19 white mongrel male rats with Guerin's carcinoma. The virus vaccine was administered in a single dose of 5000 inoculated doses paratumorally 2 times a week, 4 times in total: the first group of rats was administered 1 day after the tumor was transplanted, and the second group one week before tumor transplantation. In peripheral blood collected from the femoral vein of animals, a subpopulation of lymphocytes was determined 2 times a week for two weeks after the end of the administration of the virus to the second group. The relative amount of T-and B-lymphocytes was estimated by flow cytometry. The stimulating effect of the virus of Newcastle disease of the vaccine strain La-Sota on the T-cell link of rats was shown. The results made it possible to establish differences in the nature of the immunological changes developing in tumor-bearing rats, depending on the time of administration of the virus relative to the time of tumor transplantation and their possible significance for obtaining a prophylactic effect on transplanted tumors in some animals. The virus of Newcastle disease in the early periods after administration causes a marked increase in the level of T cells with an early activation marker while the level of CD3+CD8+ cells in the animals is lowered before the Guerin tumor is transplanted, and after the transplantation they had higher levels of CD3+CD4+ lymphocytes compared to other groups. In control animals the highest CD3+CD8+ and the lowest CD3+CD25+ cells' levels were observed during the whole period.

Keywords: Newcastle disease virus, oncolysis.

В настоящее время для биотерапии опухолей считается многообещающим сочетание стратегий, направленных как на разрушение опухолевых клеток, так и на индукцию

иммунного ответа против них путем активации врожденного и адаптивного иммунитета. Перспективной в этом плане является онколитическая виротерапия (ОВ) с использованием непатогенных для человека вирусов, избирательно накапливающихся в опухолевых клетках. Стимуляция долгосрочных противоопухолевых иммунных реакций в организме опухоленосителя считается важным компонентом индукции противоопухолевого эффекта при проведении виротерапии, которая может стать основой нового подхода к лечению рака; возможно, в сочетании со стандартной терапией [1].

При выборе ОВ для разработки биотерапевтических продуктов принципиальным моментом является их непатогенность для человека. Первыми официально разрешенными вирусными противоопухолевыми препаратами стали генномодифицированные штаммы аденовируса человека с повышенной избирательностью действия на опухолевые клетки [2, 3]. Помимо них предложены еще некоторые онколитические вирусы, которые проходят клинические испытания, такие как пикорнавирусы родов: polio- [4], сене-SVV [5]; энтеровирусы ЕСНО [6] и Коксаки А21 [7]. Однако наиболее привлекательными в качестве противоопухолевых препаратов являются онкотропные вирусы животных, к которым у человека нет приобретенного в детстве иммунитета (вирусы болезни Ньюкасла, энтеровирусы, парвовирусы животных, вирус везикулярного стоматита и поксвирусы: осповакцины и оспы птиц) [8]. Одними из перспективных представляются вирусы семейства Paramyxoviridae, в частности вирус болезни Ньюкасла (ВБН), не являющийся патогенным для человека [9] и обладающий онколитическим и иммуностимулирующим действием.

В США была проведена I фаза клинических испытаний штамма PV701 ВБН. В этом исследовании принимали участие 79 пациентов с различными прогрессирующими онкологическими заболеваниями, которым не помогала традиционная терапия. У некоторых пациентов под действием внутривенного введения PV701 наблюдалось развитие частичного ответа на лечение [10]. Liang и соавт. (2003) сообщали об обширном исследовании, в котором терапию опухолей ЖКТ проводили вакциной из аутологичных опухолевых клеток, модифицированных онколитическим штаммом La Sota ВБН. Это была III фаза исследования, в которой сравнивали 310 пациентов с резецированным колоректальным раком I–IV стадий и проведенной иммунотерапией с 257 пациентами, получавшими только хирургическое лечение. Медиана общей выживаемости в группе с вакцинациями составляла более 7 лет по сравнению с 4,46 годами в группе только с резекцией. Данные были статистически значимыми [11].

В последние годы предложен ряд препаратов на основе вирусов (Ригвир, Канцеролизин, Онкорин); исследования по отбору и генетической модификации ОВ с целью усиления их противоопухолевых свойств продолжаются.

**Цель исследования.** Экспериментальное изучение влияния введения вакцинного штамма ВБН на рост перевивной опухоли карциномы Герена, продолжительность жизни и показатели клеточного иммунитета крыс-опухоленосителей.

**Материал и методы исследования.** В работе использован препарат «Вакцина против Ньюкаслской болезни (НБ) живая сухая (штамм Ла-Сота)».

Работа выполнена на 19 белых беспородных крысах-самцах. Для индукции опухолевого процесса животным подкожно перевивалась карцинома Герена. Вирус-вакцину ВБН вводили в разовой дозе 5000 прививных доз (1 флакон) паратуморально, 2 раза в неделю, всего 4 раза: 1-й группе крыс введение начинали через 1 день после перевивки опухоли, 2-й группе – за неделю до перевивки. Животным контрольной группы подкожно вводили физиологический раствор. В 1-й и 2-й группах было по 7 животных, в 3-й (контрольной) – 5 крыс. Все процедуры введения препарата фиксировались в листе введения.

Наблюдение за животными и замеры опухоли с вычислением ее объема проводили ежедневно, фиксируя результат в протоколе эксперимента. Сведения о погибших животных отмечали в протоколе.

Правовые и этические нормы содержания и использования животных соблюдались в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

В периферической крови, собранной из бедренной вены животных, определяли субпопуляционный состав лимфоцитов 2 раза в неделю в течение двух недель по окончании введения вируса второй группе. Относительное (процентное) количество Т- и В-лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD25+, CD45RA+ клеток) исследовали методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител (МАТ) фирмы BD Pharmingen Rat T/B/NK Cell Cocktail, BD Pharmingen Rat Activated T Lymphocyte, BD Pharmingen Rat T Lymphocyte Cocktail по методике, рекомендованной производителем.

Интерпретация результатов производилась согласно стандартам иммунофенотипирования и специально разработанным алгоритмам.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Как видно из рисунка 1, у крыс 2-й группы с введением ВБН до перевивки отмечен меньший объем опухоли по сравнению с теми, кому ВБН вводили после перевивки карциномы Герена; различия регистрировались на протяжении 6 недель наблюдения, однако не достигали статистической достоверности вследствие широкой индивидуальной вариабельности внутри каждой из сравниваемых групп.

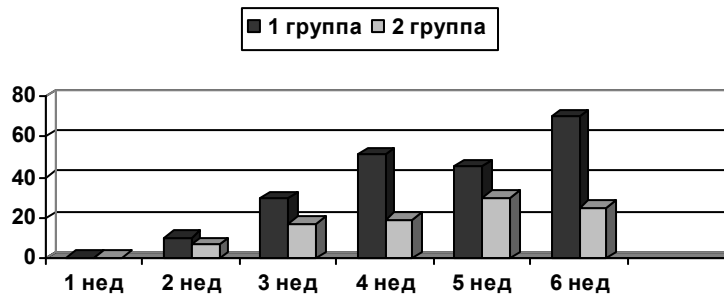


Рис. 1. Средние объемы опухоли у крыс 2-й и 1-й опытных групп, получавших ВБН.  
Ось X – недели после перевивки; Ось Y – объем опухоли (см<sup>3</sup>)

Крысы 2-й группы, которым введение ВБН начинали до перевивки, погибли на 21-й, 28-й, 37-й, 57-й дни после нее; средняя продолжительность жизни составляла  $35,8 \pm 10,1$  дней. Крысы 1-й группы, которым ВБН вводили после перевивки опухоли, погибли на 29–45-й дни после перевивки, средняя продолжительность жизни составляет  $34,0 \pm 2,1$  дня.

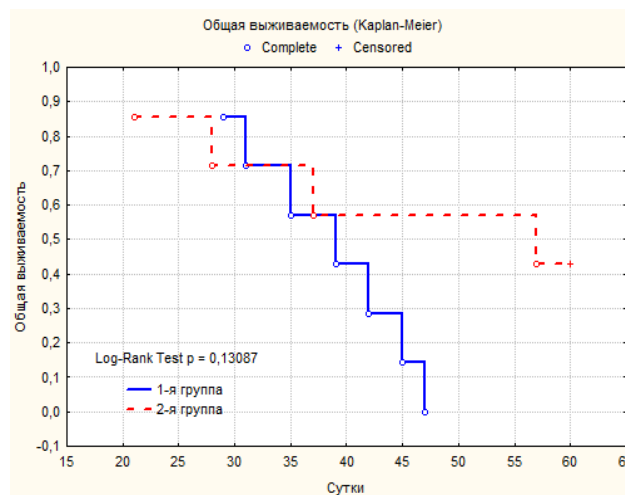


Рис. 2. Общая выживаемость крыс 1-й и 2-й групп, получавших ВБН

Как видно из рисунка 2, различия общей выживаемости крыс в зависимости от времени введения ВБН были статистически недостоверны; их продолжительность жизни после перевивки не отличалась и от контроля (таблица). Однако в отличие от крыс, которым ВБН вводили после перевивки опухоли Герена, среди животных, получавших ВБН до перевивки, были такие, у которых опухоль не перевилась или регрессировала на ранних сроках (2–3 недели после перевивки). Таких крыс было 3 из 7, их не учитывали при расчете продолжительности жизни, поскольку они живы более 6 месяцев. В 1-й группе таких крыс не было, опухоль развилась у всех 7 животных и не регрессировала ни у одного (таблица).

Динамика роста перевиваемой карциномы Герена и продолжительность жизни крыс  
опытных и контрольной групп

Группы крыс	Объем опухоли (см <sup>3</sup> )			Число выживших животных			Продолжительность жизни после перевивки (дни)
	1 месяц	1,5 месяца	2 месяца	1 месяц	1,5 месяца	2 месяца	
1	51,4	70	–	7/7	4/7	0/7	34,0±2,1
2	19,5	25,4	–	5/7	4/7	3/7	35,8±10,1
3	78,7	93,9	–	4/5	2/5	0/5	37,2±6,2

Результаты иммунологических исследований, проведенных у животных, получавших ВБН, и контрольных в динамике наблюдения, представлены на рисунке 3.

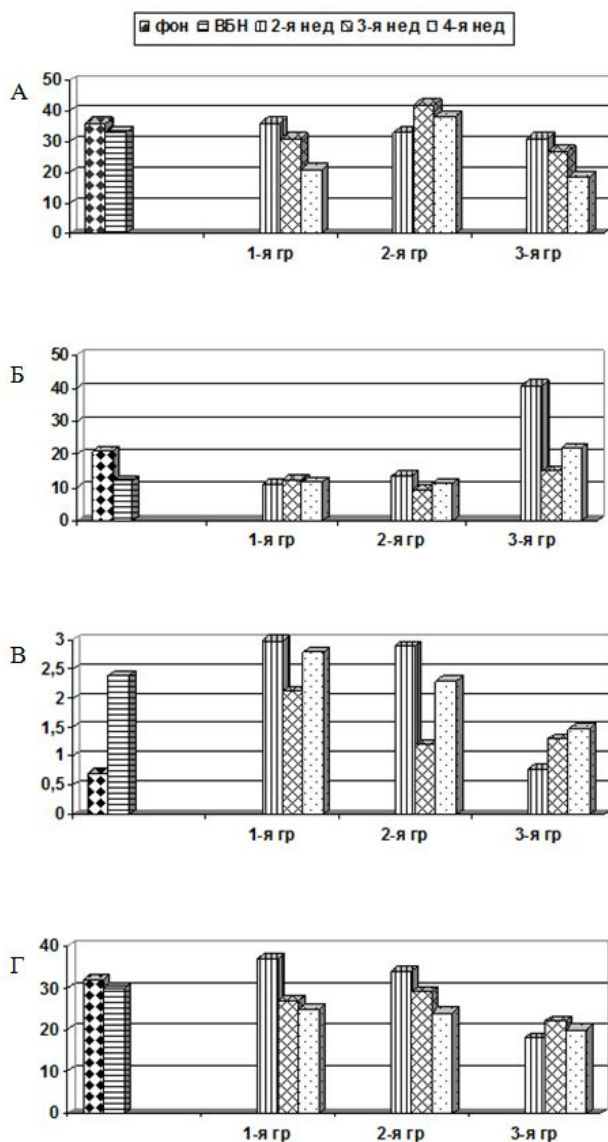


Рис. 3. Уровни CD3+CD4+ (А), CD3+CD8+ (Б), CD3+CD25+ (В), CD45RA+ (Г) в динамике наблюдения у крыс после перевивки карциномы Герена. Ось Y – %

Как видно из рисунка 3А, уровень CD3+CD4+ лимфоцитов в динамике проведения эксперимента в контрольной и в 1-й опытной группах снижался, а во 2-й опытной (с предварительным введением ВБН) не имел статистически значимых отличий от исходных и возрастал по сравнению с контрольной (3-й) и 1-й группой. Так, через 3 недели уровень CD3+CD4+ у крыс 2-й группы составлял  $42,0 \pm 5,7\%$ , а в контроле –  $27,3 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,05$ ); через 4 недели различия сохранялись ( $38,7 \pm 11$  против  $18,5 \pm 1,6\%$ ;  $p < 0,05$ ). У животных 1-й группы происходило статистически достоверное снижение этих лимфоцитов через 4 недели (с  $35,9 \pm 4,5$  до  $20,6 \pm 3,7\%$ ,  $p < 0,05$ ). Интересно, что введение ВБН животным, которым опухоль еще не перевивали, не вызвало изменения уровня CD3+CD4+, в отличие от уровня CD3+CD8+ клеток, количество которых снижалось под воздействием введения ВБН еще до перевивки опухоли (рис. 3Б).

Как видно из рисунка 3Б, после перевивки опухоли количество CD3+CD8+ оказалось максимальным в контрольной группе, особенно на 2-й неделе после перевивки. В этот срок, а также через 4 недели оно статистически достоверно превышало уровни этих клеток у крыс обеих опытных групп (через 2 недели  $41,1 \pm 7,0\%$  против  $11,0 \pm 2,4\%$  в 1-й и  $13,5 \pm 2,5\%$  во 2-й группе; через 4 недели  $22,1 \pm 4,9\%$  против  $11,6 \pm 2,0\%$  в 1-й и  $11,3 \pm 1,3\%$  во 2-й группе; во всех случаях  $p < 0,05$ ).

Как видно из рисунка 3В, введение ВБН вызывает повышение уровня активированных Т-клеток с маркером ранней активации (CD25+), который в дальнейшем после перевивки в обеих опытных группах менялся волнообразно. Количество этих клеток у контрольных животных постепенно возрастало, хотя ко 2-й неделе было статистически достоверно ниже, чем в обеих опытных группах ( $0,78 \pm 0,28\%$  против  $2,91 \pm 0,33\%$  и  $2,99 \pm 0,34\%$  соответственно,  $p < 0,05$ ), а к 4-й неделе и не достигало значений, наблюдаемых у опытных крыс 1-й группы ( $1,47 \pm 0,3\%$  и  $2,79 \pm 0,16\%$  соответственно,  $p < 0,05$ ).

Как видно из рисунка 3Г, уровни В-лимфоцитов не меняются после введения ВБН, однако через 2 недели после перевивки опухоли у крыс 1-й и 2-й групп они превышают контрольные показатели в 2 раза, а затем снижаются до уровня контрольных животных.

Комбинация иммунотерапии и виротерапии опухолей предполагает их синергизм, включающий инициацию иммунного ответа на антигены вирусов, а также частично разрушенных под действием онколитических вирусов опухолевых клеток. Механизмы цитопатического действия ВБН связаны с индукцией апоптоза, апоптоз-опосредованного некроза, аутофагии и синцитиеобразованием. Хотя штамм ВБН Ла-Сота и считается нелитическим, т.е. не приводящим к образованию синцития, у него описан такой механизм повреждения опухолевых клеток, как индукция апоптоза [12], показанный *in vitro*, а его

иммуногенные свойства могут быть использованы для стимуляции противоопухолевого ответа [13].

В нашей работе оценка показателей Т- и В-клеточного звена у крыс продемонстрировала, что введение ВБН до перевивки опухоли Герена вызывает выраженное повышение уровня Т-лимфоцитов с маркером ранней активации (CD3+CD25+) при снижении уровня CD3+CD8+ клеток. Мы предполагаем, что такая подготовка дает возможность сохранять более высокие уровни CD3+CD25+ и CD3+CD4+ лимфоцитов при последующей перевивке опухоли Герена по сравнению не только с контрольными животными, но и с теми, кому опухоль перевивали раньше, чем начинали вводить ВБН. Отсутствие роста опухоли у части животных, предварительно получавших ВБН, на наш взгляд, связано с полученной стимуляцией Т-клеток, сохраняющейся и в динамике наблюдения. Введение вакцины против ВБН способно не только оказывать профилактическое действие при применении для иммунизации против бронхита птиц, но и предупреждать развитие перевиваемой опухоли, хотя последнее получено и не у всех животных. Возможно, для достижения более полного эффекта следует комбинировать применение ВБН с другими методами противоопухолевых воздействий.

**Заключение.** Итак, показатели Т- и В-клеточного звена в исследуемых группах крыс демонстрируют, что ВБН в ранние сроки после введения вызывает выраженное повышение уровня Т-лимфоцитов с маркером ранней активации при снижении уровня CD3+CD8+ клеток. При последующей перевивке опухоли Герена таким животным отмечена стимуляция у них CD3+CD4+ и CD3+CD25+ лимфоцитов, в отличие от контрольных крыс. Судя по полученным результатам, стимуляция Т-клеточного звена иммунной системы крыс с помощью предварительного введения ВБН способствует индукции у части животных противоопухолевого эффекта в виде отсутствия роста опухоли или ее регрессии в ранние сроки.

### Список литературы

1. Ottolino-Perry K., Diallo J.S., Lichty B.D., Bell J.C., McCart J.A. Intelligent design: combination therapy with oncolytic viruses // *Mol Ther.* – 2010. – V. 18, № 2. – P. 251–263.
2. Yamamoto M., Curiel D.T. Current Issues and Future Directions of Oncolytic Adenoviruses // *Molecular Therapy.* – 2010. – V. 18, № 2. – P. 243–250.
3. Святченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В. и др. Онколитические аденовирусы в терапии злокачественных новообразований: современное состояние и перспективы // *Молекулярная биология.* – 2012. – Т. 46. – С. 556–569.

4. Goetz C., Gromeier M. Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2010. – V. 21. – P. 197–203.
5. Rudin C.M., Poirier J.T., Senzer N.N., Stephenson J.Jr., Loesch D., Burroughs K.D., Reddy P.S., Hann C.L., Hallenbeck P.L. Phase I clinical study of Seneca Valley Virus (SVV-001), a replicationcompetent picornavirus, in advanced solid tumors with neuroendocrine features // *Clin. Cancer. Res.* – 2011. – V. 17. – P. 888–895.
6. Israelsson S., Jonsson N., Gullberg M., Lindberg A.M. Cytolytic replication of echoviruses in colon cancer cell lines // *Virology Journal.* – 2011. – V. 8. – P. 473.
7. Skelding K.A., Barry R.D., Shafren D.R. Enhanced oncolysis mediated by Coxsackievirus A21 in combination with doxorubicin hydrochloride // *Invest New Drugs.* – 2012. – V. 30, № 2. – P. 568-81.
8. Кешелава В.В., Добровольская Н.Ю., Подольская М.В., Гармарник Т.В. Результаты исследования онколитического вируса болезни Ньюкасла в неoadьювантной терапии рака молочной железы за 3-летний период наблюдения // *Вестник РНЦПР.* – 2010. – № 10. – С.1-12.
9. Fournier P., Schirmacher V. Oncolytic Newcastle Disease Virus as Cutting Edge between Tumor and Host // *Biology.* – 2013. – V. 2, № 3. – P. 936–975.
10. Laurie S.A., Bell J.C., Atkins H.L., Roach J., Bamat M.K., O'Neil J.D., Roberts M.S., Groene W.S., Lorence R.M. A Phase 1 Clinical Study of Intravenous Administration of PV701, an Oncolytic Virus, Using Two-Step Desensitization // *Clin. Cancer. Res.* – 2006. – V. 12, № 8. – P. 2555–2562.
11. Liang W., Wang H., Sun T-M., et al. Application of autologous tumor cell vaccine and NDV vaccine in treatment of tumors of digestive tract // *World Journal of Gastroenterology.* – 2003. – V. 9, № 3. – P. 495–498.
12. Юрченко К.С., Губанова Н.В., Шестопалова Л.В., Щелканов М.Ю., Шестопалов А.М. Онколитические свойства вируса болезни Ньюкасла // *Тихоокеанский медицинский журнал.* – 2015. – № 3. – С. 14–18.
13. Schirmacher V. Immunobiology of Newcastle Disease Virus and Its Use for Prophylactic Vaccination in Poultry and as Adjuvant for Therapeutic Vaccination in Cancer Patients // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2017. – V. 18, № 5. – P. 1103.