

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Гельм Ю.В., Абакушина Е.В., Пасова И.А., Гривцова Л.Ю.

Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Резюме. Для лечения пациентов с онкологическими заболеваниями в последние годы активно развиваются методы клеточной иммунотерапии. Наиболее актуальным становится применение противоопухолевой адаптивной (от англ. adopt – принимать, усыновлять) иммунотерапии (АИТ) на основе активированных *in vitro* лимфоцитов и клеток натуральных киллеров (НК-клеток), противоопухолевый потенциал которых усиливают с помощью культивирования *in vitro* в присутствии цитокинов. При инкубации *in vitro* мононуклеаров периферической крови пациентов с цитокинами получают цитокин-индуцированные киллеры (ЦИК). Именно они являются одним из важных компонентов противоопухолевой защиты и могут использоваться для АИТ. В настоящее время исследования в области противоопухолевой АИТ продолжаются, идет поиск высокотехнологичных и безопасных методов клеточной иммунотерапии в онкологии. В статье представлены результаты *in vitro* активации лимфоцитов периферической крови 19 онкологических больных двумя способами. В присутствии интерлейкинов: IL-2, IL-12 и в присутствии интерлейкинов: IL-2 и IL-15. Методом ИФА выявлены различия в секреции цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10, IFN α и IFN γ и TNF α) активированными *in vitro* лимфоцитами. Показано, что для более ранней активации клеток *in vitro* необходимо применять IL-15. Изучена способность клеток цельной крови 20 онкологических больных, после проведения клеточной иммунотерапии и без нее, а также 10 здоровых доноров секретировать цитокины *in vitro* при спонтанном и митоген-индуцированном способе культивирования. Установлено, что клетки периферической крови онкологических больных, получающих АИТ на протяжении года и более, обладают большей способностью реагировать на стимуляцию митогеном, в отличие от больных, которым АИТ никогда не проводили, а так же относительно группы доноров, иммунная система которых также не подвергалась стимуляции. Вероятнее это можно объяснить тем, что при введении активированных *in vitro* ЦИК в организме пациента запускается ряд каскадных реакций межклеточного взаимодействия, приводящих к активации клеток иммунной системы пациента, а именно противоопухолевого иммунитета, пролиферации цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток, и подавления иммуносупрессии *in vivo*. Разработанный способ получения ЦИК может быть рекомендован для проведения клеточной АИТ онкологическим больным, как новый подход к активации клеток иммунной системы больного *in vivo*.

Ключевые слова: лимфоциты, активация *in vitro*, IL-2, IL-12, IL-15, клеточная иммунотерапия, активность клеток, физиологический резерв

Адрес для переписки:

Гельм Юлия Витальевна
Медицинский радиологический научный центр имени
А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии» Министерства
здравоохранения РФ
249036, Россия, Калужская обл., г. Обнинск,
ул. Королева, 4.
Тел.: 8 (484) 392-96-04.
E-mail: Julia_marizina@mail.ru

Address for correspondence:

Gelm Yulia V.
A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch
of National Medical Research Center of Radiology
249036, Russian Federation, Kaluga Region, Obninsk,
Korolev str., 4.
Phone: 7 (484) 392-96-04.
E-mail: Julia_marizina@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.В. Гельм, Е.В. Абакушина, И.А. Пасова,
Л.Ю. Гривцова «Разработка подходов к клеточной
иммунотерапии онкологических больных» //
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 381-388.
doi: 10.15789/1563-0625-DOA-2135
© Гельм Ю.В. и соавт., 2021

For citation:

Yu. V. Gelm, E. V. Abakushina, I. A. Pasova, L. Yu. Grivtsova
“Development of approaches for cellular immunotherapy
of cancer patients”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 2,
pp. 381-388. doi: 10.15789/1563-0625-DOA-2135
DOI: 10.15789/1563-0625-DOA-2135

DEVELOPMENT OF APPROACHES FOR CELLULAR IMMUNOTHERAPY OF CANCER PATIENTS

Gelm Yu.V., Abakushina E.V., Pasova I.A., Grivtsova L.Yu.

A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Abstract. To treat the patients with oncological diseases, cellular immunotherapy have been actively developed in recent years. Usage of antitumor adoptive immunotherapy (AIT) based on *in vitro* activated lymphocytes and natural killer cells (NK cells) is the most urgent issue. Their antitumor potential is enhanced by *in vitro* cultivation in the presence of cytokines. *In vitro* incubation of autologous peripheral blood mononuclear cells supplemented with cytokines produces cytokine-induced killer cells (CIK). These cells represent the important component of antitumor protection which may be potentially used for AIT. Currently, the studies in the field of antitumor AIT continues, searching for high-tech and safe methods of cellular immunotherapy in oncology. The article describes results of *in vitro* activation of lymphocytes from cancer patients ($n = 19$) in the culture media containing IL-2, IL-12 and IL-15. The ELISA assays revealed differences in the cytokine secretion (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN α , IFN γ , TNF α) after *in vitro* activation of lymphocytes. It was shown that, for earlier *in vitro* activation of cells, IL-15 should be supplemented. We also studied the ability of whole blood cells from cancer patients ($n = 20$) receiving cell immunotherapy vs those non-treated with AIT, as well as healthy donors ($n = 10$), to secrete cytokines in spontaneous and mitogen-induced cultures. Peripheral blood cells of cancer patients receiving AIT for a year or more proved to show a more pronounced ability to respond to mitogen stimulation, in contrast to the patients who have never received AIT, as well as in relation to a group of donors whose immune system has not been stimulated either. Most likely, this may be explained by the fact, that the *in vitro* activated CIKs if introduced into the patient's body, trigger a number of cascade-like intercellular interactions leading to activation of the patient's immune system cells, especially, antitumor immunity, proliferation of cytotoxic lymphocytes and NK cells, like as *in vivo* inhibition of immunosuppression. The developed method of CIK production may be offered for carrying out cellular AIT in oncological patients as a novel approach to *in vivo* activation of the patient's immune system.

Keywords: lymphocytes, *in vitro* activation, IL-2, IL-12, IL-15, cell immunotherapy, cell's activity, physiological reserve

Введение

Адоптивная (от англ. adopt — принимать, усыновлять) сопроводительная иммунотерапия (АИТ) является одним из перспективных направлений современной онкоиммунологии, которая направлена на активацию противоопухолевой активности и усиление эффекторного звена иммунного ответа за счет цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток [6, 9, 10, 11, 12, 14]. К таким исследованиям с полным основанием можно отнести работы связанные с развитием новых методов АИТ, которые недавно продемонстрировали положительные результаты в лечении ряда онкологических заболеваний [6, 7, 8, 14]. АИТ направлена на усиление противоопухолевого ответа за счет введения больному различных типов иммунных клеток, включая дендритные клетки (ДК), CTLs, лимфокин-активированные киллерные клетки, цитокин-индуцированные киллерные клетки (ЦИК) и НК-клетки. Подобные подходы показывают хороший терапевтический ответ у больных с распространенными

формами рака [7]. Основным преимуществом адоптивной иммунотерапии является прямое противоопухолевое действие активированных иммунокомпетентных клеток. В настоящее время исследования в области противоопухолевой АИТ продолжают, идет поиск высокотехнологичных и безопасных методов клеточной иммунотерапии в онкологии [2, 6, 12, 15].

В регуляции иммунного ответа большую роль на всех этапах его развития играют цитокины. Уровень концентрации цитокинов в сыворотке или плазме крови отражает состояние иммунной системы пациента, в частности работу гуморального и клеточного звена иммунитета, тогда как в ситуациях, сопряженных с дефицитом или дисбалансом регуляторных факторов, необходимо оценить способность клеток крови к секреции цитокинов [1, 3, 4, 5, 13]. При этом спонтанная продукция цитокинов свидетельствует о том, насколько клетки крови уже активированы *in vivo*, в то время как митоген-индуцированная (МИ) продукция позволяет оценить потенциальную способность клеток к секреции цитокинов в от-

вет на стимул, то есть узнать физиологический резерв активности клеток у данного конкретного пациента. Поэтому выявление способности клеток крови онкологических больных до и на этапах проведения адоптивной АИТ к индукции различных цитокинов и их соотношений в крови позволит выявить как дисфункцию, так и степень активности клеток иммунной системы.

Материалы и методы

Образцы периферической крови получены у 39 онкологических больных (меланома – 20 человек, рак кишечника – 3, рак желудка – 1, рак поджелудочной железы – 1, опухоль пищевода – 1, рак ротоглотки – 2, рак молочной железы – 5, рак легкого – 2, опухоли матки – 3, и опухоли предстательной железы – 1) и у 10 здоровых доноров (контрольные образцы периферической крови). У больных и доноров получено информированное согласие. Дизайн исследования представлен в таблице 1.

Выделение ПМН, изучение морфологии и жизнеспособности лимфоцитов

Мононуклеары периферической крови выделяли на градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077$), из 30 мл гепаринизированной венозной крови, путем центрифугирования при 2000 оборотов/мин, далее дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и доводили до концентрации 1,5-2 млн/мл. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью 0,4% раствора трипанового синего (Биолот, Россия), а именно в

камере Горяева пересчитывали в процентах долю мертвых, т.е. в которые проник краситель, от общего количества клеток.

Активация лимфоцитов *in vitro* с помощью ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15

Активацию и культивирование выделенных мононуклеаров проводили до 10 дней в пластиковых флаконах с вентилируемой крышкой (в условиях CO₂-инкубатора) в питательной среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с рекомбинантными человеческими (rh) интерлейкинами: в среде 1 (n = 7) с добавлением ИЛ-2 и ИЛ-12, в среде 2 (n = 12) с добавлением ИЛ-2 и ИЛ-15. Через каждые 48-72 часа обновляли половину объема питательной среды. На 3-й и 7-й дни активации отбирали часть активированных лимфоцитов, осаждали центрифугированием, собирали и замораживали супернатант для иммуноферментного анализа (ИФА)

Спонтанная и митоген-индуцированная (МИ) активация клеток крови

В исследование включены две группы больных. Одну группу (n = 10) составили онкологические больные, получающие непрерывно клеточную АИТ не менее года (группа АИТ+). Вторую группу (n = 10) составили онкологические больные, не получавшие ранее адоптивную клеточную АИТ (группа АИТ-). Контрольная группа – здоровые доноры крови (n = 10).

Для группы больных, получающих АИТ в непрерывном режиме на протяжении года и более, проводилась активация предварительно выделенных лимфоцитов. Для культивирования и

ТАБЛИЦА 1. ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. STUDY DESIGN

Оценка влияния интерлейкинов (IL): IL-2, IL-12, IL-15 на цитокинопродукцию иммунокомпетентных клеток (ЦИК) Assessment of the effect of interleukins (IL): IL-2, IL-12, IL-15 on cytokine production of immunocompetent cells (CIK)		Спонтанная и митоген индуцированная активация клеток цельной крови Spontaneous and mitogen-induced activation of whole blood cells		
Среда 1 Medium 1	Среда 2 medium 2	1 группа (АИТ+) Group 1 (AIT+)	2 группа (АИТ-) Group 1 (AIT-)	Контрольная группа (доноры) Control Group (donors)
компоненты среды: IL-2 и IL-12 medium components: IL-2 and IL-12	компоненты среды: IL-2 и IL-15 medium components: IL-2 and IL-15	инкубация цельной крови: спонтанная и МИ whole blood incubation: spontaneous and MI		
время инкубации: 7-10 суток incubation time: 7-10 days		время инкубации: 1-е сутки incubation time: 1 st day		
n = 7	n = 12	n = 10	n = 10	n = 10
ИФА супернатантов 3-й и 7-й дни, сравнение ELISA of supernatants 3 rd and 7 th days, comparison		ИФА супернатантов при спонтанном и МИ способе культивирования, сравнение ELISA of supernatants with spontaneous and MI cultivation, comparison		

МИ активации клеток цельной крови больных и доноров по инструкции фирмы производителя использовали специальные наборы реагентов «Цитокин-стимул-бест» (АО «Вектор-Бест»). Митоген содержал фитогемагглютинин – 4 мкг, конканавалин А – 4 мкг и липополисахарид – 2 мкг. Через сутки инкубации флаконы вскрывали, содержимое переносили в пробирки, клетки осаждали центрифугированием при 3000 оборотов/мин в течение 10 минут, собирали и замораживали супернатант для оценки концентрации цитокинов методом ИФА.

Имуноферментный анализ (ИФА)

В супернатантах, полученных на этапах инкубации мононуклеаров и цельной крови, определяли концентрации цитокинов: IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10, IFN α и IFN γ и TNF α , инкубацию проводили с помощью наборов реагентов «Вектор-Бест» по инструкции фирмы производителя. Одновременно в тот же планшет вносили в дублях калибровочные и контрольные образцы. По окончании всех необходимых инкубаций

и промывок вносили стоп-реагент и измеряли оптическую плотность образцов на фотометре ChroMate (Awareness Technology, США) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 620 нм. Далее вычисляли среднее арифметическое значение оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольные и анализируемые образцы. Строили в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации цитокина в калибровочных образцах (пг/мл) и определяли по графику концентрацию цитокина в контрольных и анализируемых образцах.

Проведение АИТ онкологическим больным цитокин-индуцированными киллерными (ЦИК) клетками

Для получения ЦИК проводили активацию и культивирование мононуклеаров течение 10-14 дней в пластиковых флаконах с вентилируемой крышкой (в условиях CO₂-инкубатора) в пита-

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ (пг/мл) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ И ВРЕМЕНИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) пг/мл

TABLE 2. CONCENTRATIONS OF CYTOKINES IN SUPERNATANTS OF CANCER PATIENTS (pg/ml) DEPENDING ON THE CONDITIONS AND TIME OF CULTIVATION, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) pg/ml

Цитокин Cytokine	Среда 1 (IL-2 + IL-12) Medium 1 (IL-2 + IL-12) n = 7		Среда 2 (IL-2 + IL-15) Medium 2 (IL-2 + IL-15) n = 12	
	3-е сутки (пг/мл) 3 rd day (pg/ml)	7-е сутки (пг/мл) 7 th day (pg/ml)	3-е сутки (пг/мл) 3 rd day (pg/ml)	7-е сутки (пг/мл) 7 th day (pg/ml)
IL-2	104,0 (102,0-117,5)	117,0 (105,0-125,0)	86,0 (68,0-117,0)	107,0 (66,3-111,0)
IL-4	2,0 (1,0-3,5)	11,0 (6,5-20,0)*	3,0 (3,0-3,0)	13,0 (5,8-38,5)*
IL-6	57,0 (17,0-177,0)	236,0 (205,0-276,5)	206,5 (204,8-221,8)	214,0 (207,8-224,0)
IL-10	63,0 (58,0-97,5)	91,0 (80,5-105,0)	157,0 (93,0-306,3)**	120,5 (82,8-146,8)
IFN α	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (0,5-2,0)	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,3)
IFN γ	64,0 (28,0-896,0)	900,0 (702,0-1105,0)	589,0 (282,0-889,0)	1187,5 (1115,0-1294,5)*.***
TNF α	25,0 (14,0-143,5)	184,0 (176,5-208,0)*	57,0 (38,3-184,0)	176,5 (144,5-206,0)

Примечание. * p < 0,05 – цитокинопродукция в супернатантах на 7-е сутки активации по сравнению с 3-ми сутками внутри группы (в среде 1 и в среде 2); ** p < 0,05 – цитокинопродукция в супернатантах на 3-и сутки активации лимфоцитов в среде 2 по сравнению со средой 1; *** p < 0,05 – цитокинопродукция в супернатантах на 7-е сутки активации лимфоцитов в среде 2 по сравнению со средой 1.

Note. * p < 0.05, cytokine production in supernatants on the 7th day of activation compared to 3 days within the group (in medium 1 and in medium 2); ** p < 0.05, cytokine production in supernatants on 3rd day of lymphocyte activation in medium 2 compared with medium 1; *** p < 0.05, cytokine production in supernatants on the 7th day of lymphocyte activation in medium 2 compared to medium 1.

ТАБЛИЦА 3. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ СПОНТАННОМ И МИ-СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

TABLE 3. CYTOKINE PRODUCTION OF BLOOD CELLS OF HEALTHY DONORS AND CANCER PATIENTS WITH SPONTANEOUS AND MI CULTIVATION

Цитокин Cytokine	Контрольная группа (доноры), пг/мл Control group (donors), pg/ml (n = 10)		1-я группа (АИТ+), пг/мл Group 1 (AIT+), pg/ml (n = 10)		2-я группа (АИТ-), пг/мл Group 2 (AIT-), pg/ml (n = 10)	
	Спонтанная Spontaneous	МИ MI	Спонтанная Spontaneous	МИ MI	Спонтанная Spontaneous	МИ MI
IL-2	6,1 (0,3-10,3)	109,6 (59,1-182,3)*	3,7 (0,5-8,2)	45,9 (44,3-84,5)*.***	0,0 (0,0-3,5)**	50,6 (7,5-67,1)*.***
IL-4	3,2 (1,0-6,4)	6,0 (5,1-7,5)	0,5 (0,0-1,9)**	5,2 (4,4-5,8)*	0,0 (0,0-0,8)**	5,3 (2,8-8,9)*
IL-6	14,5 (10,5-40,7)	8695,0 (7350,0-9793,8)*	28,3 (15,4-54,5)	11202,5 (8998,8-13751,3)*.***	27,2 (8,1-57,0)	9585,0 (5435,0-18451,3)*
IL-10	2,4 (0,8-3,8)	166,6 (123,1-202,8)*	0,6 (0,0-4,7)	147,3 (123,6-207,4)*	3,0 (0,0-6,9)	167,1 (124,6-197,5)*
IFNα	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,2)
IFNγ	0,0 (0,0-2,9)	1324,1 (583,4-3268,5)*	0,0 (0,0-0,0)	1935,2 (1393,4-2847,2)*	0,0 (0,0-0,0)	479,8 (399,5-1525,5)*
TNFα	4,9 (0,1-10,5)	555,0 (162,0-813,0)*	0,4 (0,0-8,4)	977,0 (789,3-1238,5)*.***	0,0 (0,0-12,2)	674,0 (560,5-926,0)*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению МИ способа культивирования со спонтанным внутри каждой группы, ** – по сравнению больных без АИТ и после АИТ с группой доноров (спонтанный способ культивирования), *** – по сравнению больных без АИТ и после АИТ с группой доноров (МИ способ культивирования).

Note * $p < 0.05$ compared to MI with spontaneous cultivation within each group; **, compared to patients without AIT and after AIT with a donor group (spontaneous cultivation); ***, compared to patients without AIT and after AIT with a group donors (MI method of cultivation).

тельной среде с добавлением IL-2 «Биотех» и IL-15 “Cloud-Clone Corp.”. Курс АИТ состоял из 10 внутрикожных инъекций ЦИК, инсулиновым шприцом паравертебрально в 2-4 точки. Курсы адоптивной иммунотерапии проводились в рамках выполнения Госзадания и научных протоколов МРНЦ им. А.Ф. Цыба, одобренных этическим комитетом Центра. Каждый больной подписывал информированное согласие на проведение АИТ.

Статистический анализ результатов

Анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007, данные представлены как медиана (Me) и диапазон квартильных отклонений ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Достоверности различий продукции цитокинов клетками доноров, онкологических больных получивших и не получивших АИТ после спонтанной и МИ активации оценивали по U-критерию Манна–Уитни. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Влияние IL-2, IL-12, IL-15 на продукцию цитокинов лимфоцитами крови онкологических больных

Жизнеспособность ЦИК-клеток онкологических больных, при выращивании в различных условиях (среда 1 и среда 2) была достаточно высокой (92,0%) и не отличалась от условий культивирования. Ко 2 дню ЦИК начинали прилипать к пластику, и образовывать скопления клеток. На 2-3-и сутки постепенно начинали увеличиваться в размерах и сохраняли морфологию больших гранулярных лимфоцитов на протяжении всего периода выращивания. К 7-10-му дню отмечалась пролиферация лимфоцитов в 1,5-2 раза и их отлипание от поверхности культурального пластика, что указывает на окончание активации клеток *in vitro*, как показано нами ранее [1].

При активации ЦИК больных в среде 1 показано, что на 7-е сутки относительно 3-х суток значимо ($p < 0,05$) увеличивалось содержание IL-4 и TNF α в супернатантах (табл. 2). Парал-

тельно с увеличением IL-4 и TNF α в супернатантах установлено увеличение концентрации IL-6 в 4 раза, и IFN γ в 14 раз, однако различия не были достоверными ($p > 0,05$).

При активации клеток больных в среде 2 показано, что на 7-е сутки относительно 3-х суток значимо ($p < 0,05$) увеличивалось содержание цитокинов: IL-4 и IFN γ , в супернатантах. Отмечается увеличение TNF α в 3 раза, однако различия не были достоверными (табл. 2). IFN α выявлен в следовых количествах на 3-и и 7-е сутки при разных условиях культивирования.

При сравнении продукции цитокинов в зависимости от условий инкубации установлен ряд отличий. На 3-и сутки клетки больных в среде 1, продуцировали значимо меньшие, чем в среде 2, концентрации IL-10 – в среднем в 2,5 раза ($p < 0,05$); и IL-6 – в 3,6 раза, IFN γ – 9,2 раза и TNF α – в 2,3 раза, однако данные различия не были достоверными (табл. 1). На 7-е сутки клетки больных, культивируемые в среде 1, продуцировали практически такие же концентрации цитокинов, что и в среде 2, но значимо меньшие концентрации IFN γ ($p < 0,05$).

Таким образом, обе модели культивирования приемлемы для получения ЦИК-клеток. Стимуляция IL-12 и IL-15 одинаково влияет на продукцию НК-клетками TNF α , и Т-хелперами IL-2 и IL-4 и не влияет на продукцию IFN α . IL-12 *in vitro* в меньшей степени способствует продукции IL-10, который обычно вырабатывается при активации Т-регуляторных клеток. Однако IL-15 *in vitro* способствует более ранней активации цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и НК-клеток, которые продуцируют провоспалительный цитокин – IL-6 и противоопухолевый – IFN γ .

Продукция цитокинов клетками крови здоровых доноров и онкологических больных без проведения АИТ и после АИТ при спонтанном и МИ способе культивирования

При стимулировании клеток цельной крови митогеном во всех группах, включая контрольную, отмечается выраженный рост продукции цитокинов ($p < 0,05$): IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10, IFN γ и TNF α , относительно спонтанного способа культивирования (табл. 3). Продукция IFN α определяется в следовых количествах во всех группах при спонтанном и МИ культивировании.

При митоген-индуцированном способе культивирования установлено, что у онкологических больных обеих групп в сравнении с донорами отмечается схожая тенденция к снижению уровня IL-2 в 2 раза ($p < 0,05$) и повышению уровней IL-6 ($p < 0,05$ в группе АИТ+) и TNF α ($p < 0,05$ в группе АИТ+). При сопоставлении групп АИТ+ и АИТ- установлено значительное повышение

уровней IL-6, IFN γ и TNF α , а также некоторое снижение уровня IL-10 в группе АИТ+.

Обсуждение

Основными продуцентами IL-4 являются Th2-лимфоциты и НК-клетки, кроме того IL-4 является сильным ростовым фактором для В-лимфоцитов, способен повышать экспрессию антигенов HLA-I и HLA-II, усиливать пролиферацию Т-лимфоцитов. TNF α образуется естественными киллерами, воздействует на опухолевые клетки в условиях *in vivo* за счет апоптоза, генерации активных форм кислорода и окиси азота, участвует в развитии иммунного ответа, обуславливая пролиферацию В- и Т-лимфоцитов и препятствует возникновению иммунологической толерантности [3, 4, 13]. IL-6 является мощным провоспалительным цитокином, обладающий широким спектром биологических воздействий, продуцируется Т-хелперами, НК-клетками, стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-клеток, может подавлять апоптоз нейтрофилов, обладающих цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, а также усиливает образование ЛАК-клеток (лимфокин-активированные киллеры) под влиянием IL-2 и НК-клеток (под действием IFN γ). IFN γ обладает тумороцидной и противовирусной активностью, стимулирует активность В-лимфоцитов, НК-клеток, пролиферацию и дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов [3, 4, 13]. IFN α вырабатывается лейкоцитами, являясь медиатором межклеточных взаимодействий, обладает антипролиферативным эффектом [14]. Увеличение концентрации данного цитокина будет негативно сказываться на пролиферативной активности лимфоцитов. Показано, что в данных моделях клеточной активации продукция IFN α присутствует в следовых количествах.

Для получения ЦИК, для последующей АИТ, было предложено и изучено две модели активации клеток *in vitro* с цитокинами: IL-2/IL-12 и с IL-2/IL-15. Проведен сравнительный анализ цитокинопродукции культивируемых клеток методом ИФА в супернатантах на 3-и и 7-е сутки. Показано, что стимуляция IL-12 и IL-15 одинаково влияет на продукцию НК-клетками TNF α , Т-хелперами IL-2 и IL-4, и не влияет на продукцию IFN α . Модель культивирования с IL-12 в меньшей степени способствует продукции IL-10, который вырабатывается в основном при активации Т-регуляторных клеток. Однако IL-15 в отличие от IL-12 в условиях *in vitro* способствует более ранней продукции IFN γ и IL-6, что может указывать на более раннюю активацию данных клеток *in vitro* с IL-15. Таким образом, обе модели культивирования приемлемы для получения

ЦИК, но для более ранней активации клеток *in vitro* необходимо применять именно ИЛ-15, что позволит проводить клеточную АИТ уже после 3 суток от забора крови и начала культивирования.

Установлено, что клетки периферической крови онкологических больных, получающих АИТ на протяжении года и более, обладают большей способностью реагировать на стимуляцию митогеном, в отличие от больных, которым АИТ никогда не проводили, а так же относительно группы доноров, иммунная система которых также не подвергалась стимуляции. На основании того, что ИЛ-6, IFN γ и TNF α продуцируются активированными цитотоксическими лимфоцитами и НК-клетками [3, 4, 13], можно предположить, что в организме пациента под действием АИТ в течение года в непрерывном режиме происходит активация противоопухолевого иммунитета, посредством пролиферации цитотоксических

лимфоцитов и НК-клеток, и подавления иммуносупрессии. Что говорит о возрастании физиологического резерва активности клеток пациентов, группы АИТ+, в сравнении с донорами и больными группы АИТ-. Данный факт вероятнее всего можно объяснить тем, что при введении активированных *in vitro* ЦИК в организме пациента запускается ряд каскадных реакций межклеточного взаимодействия, приводящих к активации клеток иммунной системы пациента, а именно противоопухолевого иммунитета, пролиферации цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток, и подавления иммуносупрессии *in vivo*.

Разработанный способ получения ЦИК может быть рекомендован для проведения клеточной АИТ онкологическим больным, как новый подход к активации клеток иммунной системы больного *in vivo*.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Каприн А.Д. Морфофункциональная характеристика лимфоцитов человека после активации *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016. Т. 161, № 5. С. 678-683. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Kaprin A.D. Morphofunctional characteristics of human lymphocytes after *in vitro* activation. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016. Vol. 161, no. 5, pp. 731-735. (In Russ.)]
2. Волков Н.М. Иммуноterapia рака // Практическая онкология, 2018. Т. 19, № 1. С. 38-45. [Volkov N.M. Cancer immunotherapy. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2018, Vol. 19, no. 1, pp. 38-45. (In Russ.)]
3. Ешмолов С.Н., Ситников И.Г., Мельникова И.М. Цитокины ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-8 и их роль в иммунном ответе при инфекционном поражении ЦНС у детей // Детские инфекции, 2018. Т. 17, № 1. С. 17-22. [Eshmolov S.N., Sitnikov I.G., Melnikova I.M. The role of cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-8 in the immune response in infectious lesions of CNS in children. *Detskije infektsii = Children's Infections*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 17-22. (In Russ.)]
4. Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 84-95. [Simbirtsev A.S. Immunopharmacological aspects of the cytokine system. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 84-95. (In Russ.)]
5. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С. Эффекты γ -цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15) на созревание и дифференцировку CD45RO⁺CD4⁺/CD8⁺T-лимфоцитов *in vitro* // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 45-52. [Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S. Effects of γ -cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15) upon *in vitro* maturation and differentiation of CD4⁺CD45RO⁺/CD8⁺CD45RO⁺ T cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018. Vol. 20, no. 1, pp. 45-52. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-45-52.
6. Abakushina E.V., Gelm Yu.V., Pasova I.A., Bazhin A.V. Immunotherapeutic approaches for the treatment of colorectal cancer. *Biochemistry*, 2019, Vol. 84, no. 7, pp. 720-728.
7. Chodon T., Comin-Anduix B., Chmielowski B. Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2014, Vol. 20, no. 9, pp. 2457-2465.
8. Dahlberg C.I., Sarhan D., Chrobok M. Natural killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 30, no. 6, 605. doi: 10.3389/fimmu.2015.00605.
9. Forget M.A., Malu S., Liu H. Activation and propagation of tumor-infiltrating lymphocytes on clinical-grade designer artificial antigen-presenting cells for adoptive immunotherapy of melanoma. *Immunotherapy*, 2014, Vol. 9, no. 37, pp. 448-460.
10. Gel'm Yu.V., Kuz'mina E.G., Abakushina E.V. Functional activity of lymphocytes of healthy donors and cancer patients after culturing with IL-2 and IL-15. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, Vol. 167, no. 4, pp. 486-491.
11. Granzin M., Wagner J., Kohl U. Shaping of natural killer cell antitumor activity by *ex vivo* cultivation. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 458. doi:10.3389/fimmu.2017.00458.
12. Grivtsova L.Yu. Receptor repertoire of NK-cells as a molecular basis of alloreactivity (literature review). *Hematopoiesis Immunol.*, 2018, Vol. 16, no. 1, pp. 62-108.

13. Waldmann T.A. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 12, a028472. doi: 10.1101/cshperspect.a028472.
14. Zhen Y.H., Liu X.H., Yang Y. Phase I/II study of adjuvant immunotherapy with sentinel lymph node T lymphocytes in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2015, Vol. 64, no. 9, pp. 1083-1093.
15. Zhou J. Advances and prospects in cancer immunotherapy. *New J. Sci.*, 2014, no. 1, pp. 1-13, 745808. doi: 10.1155/2014/745808.

Авторы:

Гельм Ю.В. — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Абакушина Е.В. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Пасова И.А. — врач аллерголог-иммунолог отделения лабораторной медицины, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Гривцова Л.Ю. — д.б.н., заведующая отделением лабораторной медицины, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Authors:

Gelm Yu.V., Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Abakushina E.V., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Pasova I.A., Clinical Allergist-Immunologist, Department of Laboratory Medicine, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Grivtsova L. Yu., PhD, MD (Biology), Head, Department of Laboratory Medicine, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation