

ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ФИДЕРНЫМИ КЛЕТКАМИ *IN VITRO*

Гельм Ю.В.¹, Пасова И.А.¹, Гривцова Л.Ю.¹, Константинова Т.В.¹,
Михайловский Н.В.², Рыбачук В.А.^{2,3}, Абакушина Е.В.²,
Иванов С.А.^{1,4}, Каприн А.Д.^{4,5}

¹ Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

² ООО «Текон Медицинские приборы», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

⁵ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл., Россия

Резюме. Адоптивная иммунотерапия с использованием НК-клеток стала многообещающим терапевтическим направлением. НК-клетки являются компонентом врожденной иммунной системы, действуют как ключевые регуляторы и обладают выраженной противоопухолевой цитолитической активностью. Для того чтобы стало возможным оценить терапевтический эффект адоптивной НК-клеточной иммунотерапии на доклинических этапах существует потребность в надежных протоколах для получения НК-клеток *in vitro*. Существует большое количество публикаций о способах активации и генерации НК-клеток человека, в том числе с использованием фидерных клеток и различных цитокинов.

В статье описан опыт совместного культивирования НК-клеток от онкологических больных или доноров с фидерными клетками и без них (контрольная группа). В качестве фидера использовали клеточную линию K562 после облучения двух видов: после генной модификации K562 (гмK562) мембраносвязанными mbIL15, mbIL21 и без нее. НК-клетки смешивали с фидером в соотношении 1:1, 1:2 и 1:5 на 0-й, 7-й и 14-й день соответственно. Ежедневная морфологическая оценка показала, что после 3 суток культивирования НК-клетки как доноров, так и онкологических больных начинали пролиферировать и увеличиваться в размерах, а жизнеспособность фидерных клеток начинала снижаться, и к окончанию сроков культивирования составляла менее 20%. В контрольной группе без фидера после 3-го дня культивирования НК-клетки доноров и онкологических больных уходили в апоптоз, уровень их жизнеспособности снижался до 70%.

Адрес для переписки:

Гельм Юлия Витальевна
Медицинский радиологический научный центр
имени А.Ф. Цыба
249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск,
ул. Королева, 4.
Тел.: 8 (48439) 2-96-04.
E-mail: julia_marizina@mail.ru

Address for correspondence:

Gelm Yulia V.
A. Tsyb Medical Radiological Research Center
249036, Russian Federation, Kaluga Region, Obninsk,
Korolev str., 4.
Phone: 7 (48439) 2-96-04.
E-mail: julia_marizina@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.В. Гельм, И.А. Пасова, Л.Ю. Гривцова,
Т.В. Константинова, Н.В. Михайловский,
В.А. Рыбачук, Е.В. Абакушина, С.А. Иванов,
А.Д. Каприн «Опыт культивирования НК-клеток
человека с фидерными клетками *in vitro*» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 481-490.
doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2481

© Гельм Ю.В. и соавт., 2022

For citation:

Yu.V. Gelm, I.A. Pasova, L.Yu. Gritsova, T.V. Konstantinova,
N.V. Mikhaylovsky, V.A. Rybachuk, E.V. Abakushina,
S.A. Ivanov, A.D. Kaprin "In vitro experience of human
natural killer cell culture with feeder cells", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 3, pp. 481-490.
doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2481

DOI: 10.15789/1563-0625-IVE-2481

Проведена сравнительная оценка двух разных способов получения НК-клеток человека. Показано, что при выделении НК-клеток после магнитной селекции доля CD3⁺CD56⁺CD16⁺ клеток составляла более 90%, а после удаления адгезивных клеток — не менее 60%. При культивировании НК-клеток онкологических больных после магнитной селекции совместно с гмK562 на 21-е сутки количество НК-клеток увеличивалось в 85 раз. При культивировании НК-клеток доноров совместно с обычными K562 на 21-е сутки количество НК-клеток увеличивалось только до 8 раз. Показано, что в супернатантах, собранных в процессе культивирования НК-клеток с фидерными клетками двух видов, многократно увеличивались концентрации TNF α и IFN γ относительно контрольной группы. Экспериментальным путем подобраны оптимальные условия генерации НК-клеток.

Ключевые слова: НК-клетки, мононуклеарные клетки, фидерные клетки, культивирование, пролиферация, ИФА, фенотип

IN VITRO EXPERIENCE OF HUMAN NATURAL KILLER CELL CULTURE WITH FEEDER CELLS

**Gelm Yu.V.^a, Pasova I.A.^a, Grivtsova L.Yu.^a, Konstantinova T.V.^a,
Mikhaylovsky N.V.^b, Rybachuk V.A.^{b,c}, Abakushina E.V.^b,
Ivanov S.A.^{a,d}, Kaprin A.D.^{d,e}**

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

^b Tekon Medical Devices LLC, Moscow, Russian Federation

^c Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

^d Russian University of the People's Friendship, Moscow, Russian Federation

^e National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Abstract. Adoptive immunotherapy using NK cells has become a promising therapeutic area. NK cells are a component of the innate immune system, act as key regulators, and have potent antitumor cytolytic activity. In order to be able to evaluate the therapeutic effect of adoptive NK cell immunotherapy at preclinical stages, there is a need for reliable protocols for *in vitro* production of NK cells. There are a large number of publications on methods for activating and generating human NK cells, including using feeder-cells and various cytokines.

The article describes the experience of cultivation of NK cells from cancer patients or donors with feeder-cells and without feeder-cells (control group). The K562 cell line was used as a feeder after irradiation of two types: after gene modification of K562 (gmK562) with membrane-bound mbIL15, mbIL21 and without it. NK cells donors and cancer patients were mixed with K562 in a ratio of 1:1, 1:2 and 1:5 on 0, 7 and 14 days respectively. Daily morphological assessment showed that, NK cells donors and cancer patients began to proliferate and increase in size, while the viability of feeder cells began to decrease after 3 days of cultivation, and they were less than 20% on 21 days. NK cells of donors and cancer patients went into apoptosis, their viability level decreased to 70% in the control group (without feeder-cells) after 3 days of cultivation.

A comparative evaluation of two different methods of obtaining human NK cells was carried out. It was shown when NK cells were isolated by magnetic selection, the proportion of CD3⁺CD56⁺CD16⁺ cells were more than 90%, and after the removal of adherent cells, it was at least 60%. When cultivating NK cells cancer patients (after magnetic separation) together with gmK562 on the 21st day, it was possible to increase the number of NK cells up to 85 times. When cultivating NK cells donors (after adhesion) together with non-genetically modified K562 cells on 21 days, it was possible to increase the number of NK cells up to 8 times. It was shown that in the supernatants collected during the cultivation of NK cells with feeder cells (both irradiated with K562 and genetically modified with K562), the concentrations of TNF α and IFN γ increased many times relative to the control group. The optimal conditions for culturing NK cells were experimentally selected to obtain a large number of NK cells.

Keywords: NK cells, mononuclear cells, feeder cells, culture, proliferation, ELISA, phenotype

Введение

Основываясь на уникальных свойствах клеток естественных киллеров (НК-клеток), их применение в клинической практике может иметь важное терапевтическое значение при лечении рака [4, 5, 6, 11, 13]. Способность НК-клеток естественным способом лизировать опухолевые клетки без предварительной сенсibilизации и обеспечивает их основную роль в иммунном надзоре против злокачественных клеток. Из-за ограниченного клинического использования и токсичности химиотерапии дополнительной опцией для увеличения показателей выживаемости онкологических больных может служить адаптивная иммунотерапия (АИТ) (от англ. adopt – переносить, усыновлять) с применением цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток [7, 8]. АИТ позволяет использовать иммунную систему организма больного для того, чтобы уничтожить раковые клетки. Хотя недавно был достигнут некоторый прогресс в терапии дендритными клетками и цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLs), их клиническое применение ограничено необходимостью распознавания опухолевого антигена. Однако большинство антигенов, экспрессируемых опухолевыми клетками, идентичны генным продуктам нормальных клеток. В противоположность этому НК-клетки имеют антиген-независимую цитотоксическую активность против трансформированных клеток [5, 6, 9]. АИТ на основе НК-клеток, противоопухолевый потенциал которых усиливают с помощью культивирования *in vitro* в присутствии цитокинов и фидерных клеток (от англ. feeder cells – клетки кормилицы) проводится в некоторых странах, например, в США, Италии, Испании, Китае, Таиланде, Сингапуре и Бразилии, что указывает на повышенный интерес к данной проблеме [12, 14, 15]. Однако в Российской Федерации на сегодняшний день нет доступных исследований, посвященных длительной активации и генерации НК-клеток. Чтобы изучить потенциал цитокинов при культивировании НК-клеток, обычно используют фидерные клетки на основе K562, экспрессирующие мембран связанные химерные рецепторы IL-21 (mbIL21) и IL-15 (mbIL15), и исследуют экспансию и фенотип НК-клеток, функциональную активность в ответ на периодическую стимуляцию фидерными клетками [16]. Генерация НК-клеток в этих условиях и многократное увеличение их количества обеспечивается при длительном культивировании не менее 21 дня [15].

Для адаптивной иммунотерапии рака используются различные источники НК-клеток. Цито-

токсические НК-лимфоциты можно получить из периферических мононуклеарных клеток или из CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных клеток или из стволовых клеток пуповинной крови, однако это требует длительного периода культивирования более 21 дня, что не всегда выполнимо для лечения больных высокого риска [15]. Поэтому некоторые группы исследователей для терапии используют НК-клеточные линии (NK-92, NKL, KYNG-1, YT, NKG). Их можно модифицировать генами различных цитокинов или химерными антигенными рецепторами. Для культивирования НК-клеток обычно используют такие цитокины как IL-2, IL-15, IL-18 и IL-21 и генетически модифицированные фидерные клетки [15]. Общая γ -цепь рецепторов цитокинов IL-2, IL-15 и IL-21 была изучена в отношении активации, созревания и пролиферации НК-клеток. Известно, что IL-15 играет роль в активации и жизнеспособности НК-клеток, что обосновывает его применение для получения фидерных клеток, экспрессирующих IL-15. Разрешенным методом для получения субпопуляции НК-клеток по требованиям GMP является лейкоферез и редукция Т- и В-лимфоцитов [14].

Однако существует проблема сопоставления различных протоколов экспансии НК-клеток, т.к. продолжительность культивирования НК-клеток *ex vivo* колеблется от нескольких часов (при быстрой активации) до нескольких недель (при долгосрочном культивировании). Используются многочисленные исходные компоненты сред с различной долей НК-клеток, комбинации нескольких цитокинов в разных концентрациях. Изучаются методы культивирования НК-клеток с фидерными клетками или без них. Следовательно, существует значительный интерес к разработке методов генерации НК-клеток *ex vivo*.

Изучение динамики экспрессии цитокинов, а также цитокинопродуцирующего потенциала иммунокомпетентных клеток позволяет дополнить изучение их функциональных характеристик. TNF α образуется НК-клетками, воздействует на опухолевые клетки в условиях *in vivo* за счет запуска апоптоза, генерации активных форм кислорода и окиси азота, участвует в развитии иммунного ответа, обуславливая пролиферацию, и препятствует возникновению иммунологической толерантности. IFN γ обладает непосредственной тумороцидной и противовирусной активностью, стимулирует активность НК-клеток и пролиферацию. Уровень цитокинов может быть использован в качестве маркера для оценки степени активации и пролиферации НК-клеток.

Авторы имеют многолетний опыт работы в области культивирования лимфоцитов человека. Ранее показано, что использование комбинации IL-2, IL-15 и IL-12 в низких концентрациях способствует получению цитокин-активированных киллеров за 10-14 дней с высокой жизнеспособностью (> 95%), пролиферативной и цитотоксической активностью [1, 2]. Имеется опыт применения цитокин-активированных киллеров для АИТ онкологических больных с 2013 года, была доказана безопасность и отсутствие токсичности у данного способа лечения [3, 10]. Показано, что применение АИТ у некоторых пациентов позволяет увеличить продолжительность безрецидивного периода, уменьшить количество побочных эффектов химиотерапии и улучшить результаты комплексного лечения [3, 10].

Целью данной работы являлось изучение способов экспансии *in vitro* NK-клеток онкологических больных и доноров в сочетании с фидерными клетками с оценкой жизнеспособности, морфологии и цитокинопродукции NK-клеток на этапах длительного культивирования в течение 21 суток.

Материалы и методы

Объект исследования — периферическая кровь онкологических больных и доноров. Из гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фикола ($\rho = 1,077$) были выделены мононуклеары (МНК), далее дважды отмывали фосфатно-солевым буфером ($\text{pH} = 7,4$) и доводили до нужной концентрации. Для оценки морфологии культивируемых клеток с помощью инвертированного микроскопа (Nikon, Eclipse TS100, Япония) проводили визуальный анализ изменения формы, размеров, гранулярности и наличия адгезивных свойств у изучаемых клеток (МНК, моноциты, NK, K562, гмK562). Жизнеспособность культивируемых клеток определяли методом подсчета в камере Горяева с помощью 0,4% раствора трипанового синего («Биолот», Россия), пересчитывали в процентном соотношении долю окрашенных (мертвых) к общему количеству клеток. Индекс пролиферации (ИП) клеток определяли по формуле:

$$\text{ИП} = X_{n+1} / X_n,$$

X_n — исходное число клеток для каждой группы, X_{n+1} — конечное число выращенных для каждой группы клеток. Подсчет K562 проводили при каждой пересадке в течение всего срока культивирования и перед облучением. Оценку пролиферации фидерных клеток K562 проводили на 1-е, 3-и и 7-е сутки культивирования после облучения. Подсчет NK-клеток проводили после

выделения, затем оценку пролиферации проводили на 7-е, 14-е и 21-е сутки культивирования с фидерными клетками.

Выделение NK-клеток

Выделение NK-клеток проводили с помощью набора NK Cell Isolation Kit Human (Miltenyi Biotec, США) на магнитах по инструкции производителя (метод магнитной селекции). Либо методом адгезии моноцитов: полученные МНК доводили до концентрации 5 млн/мл, засеивали в культуральный флакон в чистой среде RPMI и инкубировали 60-90 минут, после чего собирали суспензионные клетки, центрифугировали 1000 об/мин в течение 5 минут и доводили до нужной концентрации.

Проточная цитометрия

Фенотипирование флуоресцентно меченых клеток проводили на цитофлуориметре FACScanto II (Becton Dickinson, США). Оценивали субпопуляционный состав T-, NK-клеток, маркер активации HLA-DR и маркер апоптоза CD95 на лимфоцитах. Субпопуляционный состав клеточной суспензии после культивирования NK-клеток с фидером, определяли на 7-е, 14-е и 21-е сутки.

Для оценки чистоты выделения NK-клеток из МНК, сразу после магнитной селекции или метода удаления адгезивных клеток проводили цитофлуориметрический анализ в гейтах CD45⁺ (лимфоциты), CD14⁺ (моноциты). Для фенотипирования лимфоциты отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) и окрашивали конъюгированными с PE или FITC антителами, которые связываются с антигенами клеточной поверхности, к CD3, CD4, CD14, CD16, HLA-DR, CD45, CD56, CD95 (Beckman Coulter и Becton Dickinson, США) по инструкции. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы BD FACS Diva 6-0. Для подсчета доли апоптотических и мертвых клеток применяли также метод проточной цитометрии, основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток аннексином V-AF488 (зеленая флуоресценция) — для оценки доли апоптотических клеток и пропидия иодидом (PI) (красная флуоресценция мертвых клеток). Окрашивание и инкубацию клеток с красителями, проводили по инструкции производителя.

Облучение K562

Фидерные клетки получали из клеточной линии K562, предварительно культивированные в течение 2 недель в условиях CO₂-инкубатора (37 °C, 5% CO₂). Облучение клеток проводили на установке Philips SL-20, энергия пучка 6 МэВ. Для эксперимента клетки K562 переносили в три

флакона и делили на три группы: первая – контроль (К), вторая – фракционированный способ облучения (два раза по 50 Гр с перерывом в 20 минут), третья – однократно в дозе 100 Гр в течение 25 минут. После облучения клетки K562 продолжали культивировать в течение 7 суток.

Фидерные клетки

В качестве фидерных клеток применялись клетки двух видов:

1) клетки постоянной клеточной линии миелобластного лейкоза K562, после культивирования и облучения электронами.

2) генно-модифицированные клетки K562 (гмK562), несущие на своей поверхности мембрано-связанные IL-15, IL-21 (mbIL15 и mbIL21) после облучения и криоконсервации и оттаивания, являющиеся разработкой и предоставленные ООО «СайСтарЛаб».

В эксперимент были включены данные культивирования НК-клеток, полученных от 4 доноров, которые культивировали с K562 и 2 онкологических больных, которые культивировали с гмK562. Для контроля проводили культивирование НК-клеток доноров и больных без добавления фидера.

Облучение клеток K562 проводили электронами двумя разными способами: однократно в дозе 100 Гр и фракционированно дважды по 50 Гр.

Культивирование НК-клеток с фидером

Культивирование выделенных НК-клеток в концентрации 1 млн/мл совместно с фидерными клетками проводили до 21-х суток в условиях CO₂-инкубатора в питательной среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) с IL-2 – 300 Ед/мл. Через каждые 48 часов обновляли питательную среду, добавляли IL-2 – 300 Ед/мл, ежедневно оценивали морфологию клеток. Фидерные клетки добавляли к НК-клеткам на 1-е, 7-е и 14-е сутки культивирования в соотношениях 1:1, 1:2 и 1:5 (НК:Фидер). В эти же дни отбирали часть клеток на фенотипирование, осаждали центрифугированием, собирали и замораживали супернатант для иммуноферментного анализа (ИФА). Для контроля проводили культивирование НК-клеток как после магнитной сепарации, так и после адгезии моноцитов в условиях CO₂-инкубатора в такой же питательной среде в концентрации 1 млн/мл без добавления фидера и собирали супернатант для ИФА.

Имуноферментный анализ

В супернатантах, полученных на этапах совместного культивирования НК-клеток с фидерными клетками на 7-е, 14-е и 21-е сутки, для определения функциональной активности клеток, измеряли концентрации противоопухоле-

вых цитокинов (TNF α и IFN γ). ИФА проводили с помощью наборов реагентов «Вектор Бест» по инструкции фирмы производителя. Оптическую плотность образцов измеряли на фотометре ChroMate (Awareness Technology, США) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 620 нм.

Анализ результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007, данные представляли как среднее значение по группе или среднее \pm стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Облучение фидерных клеток K562

При культивировании клеток K562 уровень жизнеспособности достигал 99,7%. Перед облучением жизнеспособность K562 составляла 80,0 \pm 11,3%. Через сутки после однократного облучения K562 (в дозе 100 Гр), жизнеспособность снижалась до 64,8 \pm 14,8%, а при фракционированном (дважды по 50 Гр) – до 65,1 \pm 12,0%. На 3-и сутки после однократного облучения количество живых фидерных клеток снижалось до 59,6 \pm 19,5%, а при фракционированном – до 52,9 \pm 10,3%. На 7-е сутки после однократного облучения количество живых фидерных клеток снижалось до 41,8 \pm 20,9; при фракционированном – до 46,1 \pm 13,9%. После однократного облучения дозой 100 Гр в течение следующих 7 суток культивирования фидерные клетки не пролиферировали. В группе с фракционированным облучением наблюдалась незначительная пролиферация клеток, относительно группы контроля.

Таким образом, изучено влияние ионизирующего излучения на пролиферативный потенциал клеток линии K562. Показано, что через 7 суток после облучения электронами однократно в дозе 100 Гр пролиферативный потенциал отсутствует, а жизнеспособность снижается за счет активации апоптоза в опухолевых клетках. Налажен способ получения фидерных клеток линии K562 для последующего культивирования с НК-клетками. Была выбрана доза облучения: 100 Гр однократно.

Экспансия НК-клеток

Метод проточной цитометрии показал, что после магнитной сепарации чистота выделения НК-клеток как доноров, так и онкологических больных (CD3⁺CD56⁺CD16⁺) составляла 90 \pm 2%, а после адгезии моноцитов – более 60 \pm 2%. Таким образом, метод магнитной селекции является наиболее эффективным. Второй способ, основанный на адгезии моноцитов, менее эффективен, но оказался приемлем для дальнейшего культивирования с фидерными клетками, а

также не требовал наличия специальных дорогостоящих наборов для выделения НК-клеток.

Морфологическая оценка НК-клеток в контрольной группе показала, что на 3-и сутки культивирования НК-клетки начинали увеличиваться в размерах и незначительно пролиферировать (20%), однако после 3 суток жизнеспособность клеток значительно снижалась, и уже на 7-е сутки составляла менее 70%, а к 14-м суткам — около 55%.

При совместном культивировании НК-клеток от онкологических больных или доноров с фидерными клетками ежедневные микроскопические наблюдения показали, что морфология НК-клеток также начинала меняться после 3 суток. Клетки увеличивались в размерах, становились гранулярными и пролиферировали в несколько раз, образуя полусферы, окружали фидерные клетки, которые в свою очередь постепенно распадались на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной, и к 7-м суткам визуально их становилось значительно меньше (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Оценив уровень пролиферации, можно отметить, что при культивировании НК-клеток гмK562 на 21-е сутки и их количество увеличивалось в 34,2-76,2 раза, а при использовании в качестве фидера обычных клеток K562 только в 4,1-8,4 раза.

Как известно, у доноров и онкологических больных процесс активации клеток *in vitro* не отличается, т.к. количество и качество НК-клеток зависит не от наличия опухоли, а от индивидуальных особенностей человека и его иммунной системы, что было нами подтверждено при изучении фенотипической характеристики и маркеров активации после совместного культивирования лимфоцитов с фидером. Из-за отсутствия существенных отличий результатов фенотипирования лимфоцитов доноров и онкологических больных, данные объединены в одну группу. В таблице 1 представлена фенотипическая характеристика лимфоцитов и маркеров активации после совместного культивирования с различными фидерными клетками: K562 и гмK562 по дням культивирования, перед добавлением новой порции фидерных клеток. Все данные представлены, как среднее значения \pm стандартное отклонение. Для определения доли фидерных клеток при фенотипировании клеточной суспензии выделяли CD45 негативный гейт и вычисляли долю мертвых клеток. Процент мертвых НК-клеток выделяли среди CD16⁺CD56⁺CD3⁻ лимфоцитов.

Доля мертвых фидерных клеток (гмK562 и K562) увеличивалась к 21-м суткам культивирования в среднем более чем на 80%. После 7 суток

наблюдалось увеличение процентного содержания НК-клеток и снижение доли Т-лимфоцитов. Показано снижение среднего количества Т-лимфоцитов на 14-е сутки в 2 раза относительно 0 суток. Также через неделю культивирования отмечена экспрессия активационного маркера HLA-DR(all) на лимфоцитах.

Таким образом, показано, что при длительном культивировании лимфоцитов онкологических больных с генно-модифицированными фидерными клетками и доноров с обычными клетками линии K562, можно получить более 50% НК-клеток, при этом их цитотоксическая активность достигает 80%.

Имуноферментный анализ

В контрольной группе, где НК-клетки доноров и онкологических больных культивировались без фидера, содержание TNF α и IFN γ в супернатантах на 7-е и 14-е сутки выявлено в следовых количествах. В таблице 2 представлены результаты иммуноферментного анализа супернатантов, собранных в процессе культивирования НК-клеток доноров и онкологических больных с различными фидерными клетками и без них. Все данные представлены, как среднее значения \pm стандартное отклонение.

При культивировании НК-клеток как доноров так и онкологических больных с фидером, в супернатантах на 7-е и 14-е сутки многократно увеличивались концентрации TNF α и IFN γ , относительно контрольной группы без фидера, что указывает на активацию НК-клеток. Показано, что в образцах с гмK562 отмечается более высокая продукция TNF α и IFN γ , в отличие от образцов с обычными клетками линии K562. Вероятно, что такое резкое увеличение уровня цитокинов на ранних сроках культивирования в образцах с гмK562 и дает возможность НК-клеткам пролиферировать в большей степени. Постепенное снижение продукции обоих цитокинов НК-клетками к 21-м суткам наблюдалось при совместном культивировании с гмK562, так концентрация TNF α уменьшилась в 2,7 раз, а IFN γ в 2,1 раза, относительно 7-х суток. Обратная тенденция к увеличению продукции цитокинов наблюдалась в группе с обычными K562. Можно отметить повышение концентрации TNF α в 4 раза и IFN γ в 2,2 раза к окончанию сроков культивирования, относительно 7-х суток. Данное явление возможно связано с более поздней активацией НК-клеток, культивируемых с K562, по сравнению с гмK562.

Таким образом, можно заключить, что применение фидерных клеток в протоколах генерации НК-клеток, позволяет получить большое коли-

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ КЛЕТОК

TABLE 1. RESULTS OF PHENOTYPING OF THE STUDIED CELLS

Показатель Indicator	Сутки Days			
	0-е сутки 0 th day	7-е сутки 7 th days	14-е сутки 14 th days	21-е сутки 21 st days
CD45 ⁺ (лимфоциты), % CD45 ⁺ (lymphocytes), %	–	62,3±10,8	60,6±21,9	58,1±14,0
Т-лимфоциты (CD3 ⁺) T lymphocytes (CD3 ⁺), %	56,9±24,9	44,2±18,1	26,4±20,4	36,8±11,9
НК-клетки (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻), % NK cells (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻), %	22,6±19,2	49,9±17,0	60,8±13,8	52,8±9,0
Живые НК-клетки от общего количества CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻ , % Live NK cells from total CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻ , %	99,5±0,6	88,5±2,0	71,0±28,9	59,4±37,2
K562 (CD45 ^{neg}), %	–	37,7±10,8	39,4±21,9	42,0±14,0
Мертвые K562 от общего количества (CD45 ^{neg}), % Dead K562 from total (CD45 ^{neg}), %	–	54,4±18,3	74,1±1,0	81,3±6,6
Маркеры активации на лимфоцитах HLA-DR(all), % Activation markers in lymphocytes HLA-DR(all), %	34,1±1,4	87,7±4,2	67,4±27,3	–
CD95 ⁺ (FAS/APO-1), %	81,7±10,4	68,0±0,7	–	–
CD3 ⁺ CD95 ⁺ , %	62,6±3,5	38,6±21,2	–	–

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИФА СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НК-КЛЕТОК ДОНОРОВ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ И РАЗЛИЧНЫХ ФИДЕРНЫХ КЛЕТОК (С ГЕННОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ – гмK562 И БЕЗ НЕЕ K562), СВОДНАЯ ТАБЛИЦА

TABLE 2. ELISA RESULTS OF CULTIVATION OF NK CELLS AND VARIOUS FEEDER CELLS

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Фидерные клетки Feeder cells	Сутки Days		
		7-е сутки 7 th days	14-е сутки 14 th days	21-е сутки 21 st days
TNF α	гмK562 gmK562	83,00±36,77	22,50±6,36	30,0±0,0
	K562	20,67±13,87	40,00±16,82	86,33±52,69
	контроль (без фидера) control (without feeder)	4,00±2,83	2,50±0,71	–
IFN γ	гмK562 gmK562	418,50±38,89	325,00±76,37	196,0±0,0
	K562	245,00±77,35	360,33±178,36	534,67±318,30
	контроль (без фидера) control (without feeder)	10,00±9,90	2,50±0,71	–

чество клеток с выраженной противоопухолевой цитолитической активностью [9, 12, 14, 15]. Однако более ранняя продукция цитокинов TNF α и IFN γ наблюдалась в образцах при культивировании НК-клеток онкологических больных и гМК562. Также наибольшего уровня пролиферации НК-клеток к окончанию культивирования удалось достигнуть, после их выделения методом магнитной сепарации и культивирования с гМК562, что является наиболее предпочтительным для получения большого количества НК-клеток. Оба вида фидерных клеток, изучаемых в

данной работе, приемлемы для активации НК-клеток, полученных от доноров или онкологических больных, так как удавалось многократно нарастить количество НК-клеток и увеличить их активационный потенциал, что и являлось целью данной работы.

Благодарности

Выражаем благодарность ООО «СайСторЛаб» за любезно предоставленную клеточную линию К562 и генномодифицированную клеточную линию К562.

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 Y.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. 678-683. (In Russ.)]
2. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С. Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro* // Гены и клетки, 2015. Т. 10, № 2. С. 78-85. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S. Efficiency of IL-2 and IL-15 combined use for activation of cytotoxic lymphocytes *in vitro*. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2015, Vol. 10, no. 2, pp. 78-85. (In Russ.)]
3. Абакушина Е.В., Пасова И.А., Маризина Ю.В., Кудрявцев Д.В., Кудрявцева Г.Т., Фомина Е.С. Клиническая эффективность сопроводительной иммунотерапии активированными лимфоцитами больной меланомой (случай из практики) // Сибирский онкологический журнал, 2016. Т. 15, № 5. С. 89-94. [Abakushina E.V., Pasova I.A., Marizina Yu.V., Kudryavtsev D.V., Kudryavtseva G.T., Fomina E.S. Efficiency of adoptive immunotherapy for melanoma: a case report. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2016, Vol. 15, no. 5, pp. 89-94. (In Russ.)]
4. Боробова Е.А., Жеравин А.А. Натуральные киллеры в иммунотерапии онкологических заболеваний // Сибирский онкологический журнал, 2018. Т. 17, № 6. С. 97-104. [Borobova E.A., Zheravin A.A. Natural killer cells in immunotherapy for cancer. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2018, Vol. 17, no. 6, pp. 97-104. (In Russ.)]
5. Вашкевич Е.П., Мигас А.А., Мелешко А.Н., Матвеев М.А., Струшкевич Н.В., Шман Т.В. Экспансия и активация естественных киллерных клеток человека *ex vivo* в присутствии трансгенных фидерных клеточных линий // Цитология, 2020. Т. 62, № 4. С. 258-265. [Vashkevich E.P., Migas A.A., Meleshko A.N., Matveyenka M.A., Strushkevich N.V., Shman T.V. Human Natural Killer cells expansion and activation *ex vivo* in the presence of transgenic feeder cell lines. *Tsitologiya = Cytology*, 2020, Vol. 62, no. 4, pp. 258-265. (In Russ.)]
6. Гривцова Л.Ю. Рецепторный репертуар НК-клеток как молекулярный базис аллореактивности (литературный обзор) // Иммунология гемопоеза, 2018. Т. 16, № 1. С. 62-108. [Gritsova L.Yu. Receptor repertoire of NK-cells as a molecular basis of alloreactivity (literature review). *Immunologiya gemopoeza = Immunology of Hematopoiesis*, 2018, Vol. 16, no. 1, pp. 62-108. (In Russ.)]
7. Лежнин Ю.Н., Христинченко А.Ю., Ратникова Н.М., Кравченко Ю.Е., Чумаков С.П. Клеточная иммунотерапия – современный подход к лечению онкологических заболеваний // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 313-340. [Lezhnin Yu.N., Khristichenko A.Yu., Ratnikova N.M., Kravchenko Yu.E., Chumakov S.P. Cellular immunotherapy: a modern approach to treatment of oncological diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 313-340. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-313-340.
8. Непомнящих Т.С., Антонец Д.В., Максюттов Р.А. Краткий обзор клинических испытаний средств иммунотерапии онкологических заболеваний // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 127-144. [Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Maksyutov R.A. Short overview of clinical trials with current immunotherapeutic tools for cancer treatment. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 127-144. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-127-144.
9. Шамова Т.В., Ситковская А.О., Ващенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э. Адоптивная клеточная терапия: достижения последних лет // Южно-российский онкологический журнал, 2020. Т. 1, № 1. С. 43-59.

[Shamova T.V., Sitkovskaya A.O., Vashchenko L.N., Kechedzhieva E.E. Adoptive cell therapy: Current advances. *Yuzhno-rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal = South Russian Journal of Cancer*, 2020, Vol. 1, no. 1, pp. 43-59. (In Russ.)]

10. Abakushina E.V., Gelm Yu.V., Pasova I.A., Bazhin A.V. Immunotherapeutic approaches for the treatment of colorectal cancer. *J. Biochemistry (Moscow)*, 2019, Vol. 84, no. 7, pp. 720-728.

11. del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *J. Cytometry B Clin. Cytom.*, 2017, Vol. 92, no. 2, pp. 100-114.

12. Fang F., Xiao W., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *J. Semin Immunol.*, 2017, Vol. 31, pp. 37-54.

13. Granzin M., Wagner J., Kohl U., Cerwenka A., Huppert V., Ullrich E. Shaping of natural killer cell antitumor activity by *ex vivo* cultivation. *J. Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 458. doi: 10.3389/fimmu.2017.00458.

14. Lee D.A. Cellular therapy: Adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *J. Immunol. Rev.*, 2019, Vol. 1, no. 290, pp. 85-99.

15. Shin M.H., Kim J., Lim S.A., Kim J., Kim S.J., Lee K.M. NK Cell-Based immunotherapies in cancer. *J. Immune Netw*, 2020, Vol. 20, no. 2, e14. doi: 10.4110/in.2020.20.e14.

16. Tarazona R., Lopez-Sejas N., Guerrero B., Hassouneh F., Valhondo I., Pera A., Sanchez-Correa B., Pastor N., Duran E., Alonso C., Solana R. Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *J. Cancer Immunol. Immunother.*, 2020, Vol. 5, no. 69, pp. 879-899.

Авторы:

Гельм Ю.В. — научный сотрудник отделения 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 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

Гривцова Л.Ю. — д.б.н., заведующая отделением 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

Константинова Т.В. — научный сотрудник отделения 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

Authors:

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

Pasova I.A., Clinical Allergologist, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Gritsova L. Yu., PhD, MD (Biology), Head, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Konstantinova T.V., Research Associate, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Михайловский Н.В. — научный сотрудник отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии ООО «Текон Медицинские приборы», Москва, Россия

Рыбачук В.А. — лаборант-исследователь отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии ООО «Текон Медицинские приборы»; студент магистратуры биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Абакушина Е.В. — д.м.н., заместитель генерального директора, руководитель отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии ООО «Текон Медицинские приборы», Москва, Россия

Иванов С.А. — д.м.н., профессор РАН, директор Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская обл.; профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики имени В.П. Харченко медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Каприн А.Д. — д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, г. Обнинск, Калужская обл.; заведующий кафедрой онкологии и рентгенодиагностики имени В.П. Харченко медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Mikhailovsky N.V., Research Associate, Department for Development and Research in Immunology, Tekon Medical Devices LLC, Moscow, Russian Federation

Rybachuk V.A., Research Laboratory Assistant, Department for Development and Research in Immunology, Tekon Medical Devices LLC; Master's Student, Faculty of Biology, Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

Abakushina E.V., PhD, MD (Medicine), Deputy General Director, Head, Department for Development and Research in Immunology, Tekon Medical Devices LLC, Moscow, Russian Federation

Ivanov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Director, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Affiliation of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region; Professor, Department of Oncology and Rentenology/Radiology, Medical Institute, Russian University of the People's Friendship, Moscow, Russian Federation

Kaprin A.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, General Director, National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Kaluga Region; Head, Department of Oncology and Rentenology/Radiology, Medical Institute, Russian University of the People's Friendship, Moscow, Russian Federation

Поступила 24.02.2022
Принята к печати 06.03.2022

Received 24.02.2022
Accepted 06.03.2022