

Активация лимфоцитов *in vitro* для иммунотерапии больных меланомой

Е. В. Абакушина^{1,2}, Ю. В. Гельм¹, Е. Ю. Лысюк³

¹Медицинский радиологический научный центр имени А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, г. Обнинск

²Обнинский институт атомной энергетики – филиал ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Обнинск

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

РЕЗЮМЕ

Описан способ активации лимфоцитов, выделенных из периферической крови больных меланомой, и культивируемых в среде, дополненной IL-2 и IL-15. Было показано, что в данной среде лимфоциты обладают повышенным пролиферативным и активационным потенциалом. Комбинация цитокинов оказывает положительное влияние на экспрессию маркеров активации NK- и T-лимфоцитов (CD38, CD69, CD25, HLA-DR и NKG2D), цитотоксичность, жизнеспособность и может быть рекомендована для культивирования лимфоцитов больных меланомой с целью проведения адоптивной иммунотерапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: активация лимфоцитов, IL-2, IL-15, естественные киллерные клетки, адоптивная иммунотерапия, меланома.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Activation of lymphocytes *in vitro* for immunotherapy of patients with melanoma

E. V. Abakushina^{1,2}, Yu. V. Gel'm¹, E. Yu. Lyssuk³

¹Medical Radiological Research Center n.a. A.F. Tsyb – a branch of Federal Medical and Biological Centre 'National Medical Research Centre for Radiology', Obninsk, Russia

²Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering – National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Obninsk, Russia

³National Medical Research Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachyov, Moscow, Russia

SUMMARY

This article describes a method for activating lymphocytes isolated from the peripheral blood of melanoma patients and cultured in a medium supplemented with IL-2 and IL-15. It was shown that in these terms, lymphocytes have an increased proliferative and activation potential. The combination of cytokines has a positive effect on cytotoxicity, viability and the expression of activation markers (CD38, CD69, CD25, HLA-DR and NKG2D) on NK- and T-lymphocyte, and may be recommended for the culture of lymphocytes in melanoma patients for the purpose of adoptive immunotherapy.

KEY WORDS: activation of lymphocytes, IL-2, IL-15, natural killer cells, adoptive immunotherapy, melanoma.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare no conflict of interest.

Список сокращений: АИТ – адоптивная иммунотерапия, ЛАК – лимфокин-активированные киллеры, ЦИК – цитокин-индуцированные киллеры, МНК – мононуклеарные клетки, NK – естественные киллеры, IL – интерлейкин, рч – рекомбинантный человеческий, Ethd-1 – этидия гомодимер-1.

Введение

В последние годы методы клеточной иммунотерапии активно развиваются для лечения пациентов с онкологическими заболеваниями [1–6]. Все более важными в лечении различных видов рака становятся интегрированные подходы с использованием адоптивной иммунотерапии (АИТ) на основе культивируемых *in vitro* лимфоцитов [7, 8].

Однако в литературе нет единого мнения по поводу оптимального метода культивирования лимфоцитов и получения фракции активированных цитотоксических лимфоцитов (ЦЛ), пригодных для АИТ. Как известно, наибольший эффект достигается при адаптивном переносе активированных IL-2 лимфокин-активированных киллеров (ЛАК), но высокие и слишком низкие концентрации дают плохой клинический результат, причем могут возникнуть тяжелые токсические побочные реакции при

введении IL-2 в больших концентрациях [9, 10]. В ряде публикаций обсуждается вопрос использования коротко-срочно активированных цитотоксических лимфоцитов с высокими концентрациями цитокинов [1, 2, 11]. Так как на сегодняшний день нет стандартизованного метода активации пула ЦЛ, разработка протоколов культивирования лимфоцитов является актуальной научно-практической задачей.

Активированные лимфоциты могут открыть новое окно, представляющее большой интерес для этого направления. Иммунотерапия, основанная на естественных киллерах (НК-) и Т-клетках, является одной из наиболее перспективных разработок для лечения многих видов рака [3]. НК-клетки являются хорошим инструментом для использования при АИТ, поскольку они эффективно распознают и убивают опухоле-

вые клетки [12–14]. Цитотоксические NK-лимфоциты можно получить из моноклеарных клеток (МНК) периферической крови или из CD34⁺-гемопоэтических стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных клеток или из клеток пуповинной крови, однако это требует длительного периода культивирования – более 21 дня, что не всегда выполнимо для лечения больных высокого риска [14, 15]. Одним из общепринятых методов увеличения активности ЦЛ является культивирование МНК *in vitro* в присутствии цитокинов, антител, ростовых факторов или фидерных клеток [16, 17]. Полагают, что ЛАК-клетки осуществляют свой эффект за счет одновременного взаимодействия сразу нескольких субпопуляций иммунокомпетентных клеток с различным фенотипом. Еще одним подходом к активации противоопухолевой активности лимфоцитов стала клеточная терапия, которая осуществляется за счет цитокин-индуцированных киллеров (ЦИК) [18]. По сравнению с ЛАК-клетками ЦИК-клетки оказывали повышенную противоопухолевую активность [19]. Активность ЦИК-клеток *in vitro* может быть повышена путем стимуляции лимфоцитов цитокинами, такими как IL-2, IL-12, IL-15 или IL-18 [2, 12]. Важную роль в противоопухолевой активности активированных ЦЛ, таких как Т-лимфоциты и NK-клетки, играют именно IL-2 и IL-15. Поэтому культивирование *ex vivo* является хорошим способом для увеличения количества Т- и NK-клеток и улучшения их противоопухолевого потенциала для клинического применения.

Развитие данного направления представляет собой новую стратегию, которая может способствовать снижению риска метастазирования и рецидива опухолевого роста. Последние исследования и клинические испытания показали, что АИТ может быть эффективным методом терапии и способствовать улучшению результатов лечения онкологических больных [20].

Несмотря на успехи в получении пула активированных лимфоцитов, на сегодняшний день нет универсального метода выращивания цитотоксических лимфоцитов. Поэтому актуален поиск эффективных способов активации *in vitro* и повышения противоопухолевой активности NK-клеток.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке оптимального метода активации лимфоцитов *in vitro* в среде, дополненной факторами роста и цитокинами, для последующего проведения иммунотерапии больным меланомой.

Материалы и методы

Исследование проводилось на образцах периферической крови 28 больных меланомой кожи в возрасте 26–82 лет (медиана 54 года) II–IV стадии заболевания. Моноклеарные клетки периферической крови (МНК) выделяли из 30 мл гепаринизированной крови по общепринятой методике в градиенте плотности Nystopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США). МНК в концентрации $(1-2) \times 10^6$ клеток/мл культивировали в среде

X-vivo 20 (Lonza, США), содержащей альбумин человека, инсулин, трансферрин и дополненной гентамицином, интерлейкином-2 (IL-2) (ронколейкин; «Биотех», Россия) в концентрации 100–250 МЕ/мл и 5–50 нг/мл IL-15 (ImmunoTools, Германия) при 5 %-ном CO₂ во влажной атмосфере при 37 °C в течение 10 дней в культуральных флаконах с вентилируемой крышкой в объеме 10 мл. Половину культуральной среды заменяли каждые 48–72 часа, и клетки собирали для исследования жизнеспособности, пролиферативной и функциональной активности.

Морфологию клеток оценивали ежедневно с использованием инвертированного фазового микроскопа Eclipse TS 100 (Nikon, Япония). Кинетику роста и функциональную активность клеток, культивированных с помощью IL-2 или комбинации IL-2 и IL-15 в 96-луночных планшетах, оценивали в автоматизированной сканирующей микроскопической системе IncuCyte Zoom (Essen BioScience, США) в течение 65 часов в CO₂-инкубаторе. Каждый час изображение областей интересов и количественных характеристик заданных параметров клеточной популяции регистрировалось автоматически. Данные обрабатывались с использованием программного обеспечения IncuCyte, и строились кривые зависимости от заданных параметров в автоматическом режиме. Жизнеспособность клеток путем окрашивания трипановым синим (0,1 %-ный раствор) и пролиферативную активность клеток, культивируемых во флаконах, оценивали с помощью счетчика клеток TC 10 (Bio-Rad, Singapore).

Фенотипирование МНК проводили на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson, США) и Navios (Beckman Coulter, США), обработка результатов осуществлялась на программном обеспечении Kaluza (Beckman Coulter). В работе оценивали субпопуляционный состав В-, Т- и NK- лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (CD38, CD69, CD25, HLA-DR и CD314 [NKG2D]) на Т- и NK-клетках сразу после выделения и после активации на 3-й, 5-й и 14-й день. Для этого проводили цитофлуориметрический анализ с использованием антител, меченых FITC, PE, PC 5, PC 5.5 (ImmunoTools, Германия; eBioscience, США; или Beckman Coulter IOTest, США). Использовали соответствующие флуорохромам изотипические контроли анти-IgG1 (mouse) (Beckman Coulter IOTest, США).

Цитотоксическую активность лимфоцитов оценивали на 0-й, 1-й, 3-й и 7-й дни активации после инкубации с клетками-мишенями K562 в соотношении 1:20 и 1:40 клеток-мишеней. Автоматические измерения флуоресценции окрашенных этидием гомодимера-1 (Ethd-1) (Molecular Probes, США) клеток-мишеней в экспериментальных лунках проводились при $\lambda = 528/617$ нм каждый час после. Данные обрабатывались с использованием программного обеспечения IncuCyte.

Анализ данных проводили с помощью программы MS Excel 2007, достоверности различий оценивали по U-критерию Манна – Уитни или t-критерию Стьюдента, отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В настоящем исследовании, основываясь на данных по активации лимфоцитов и получению ЛАК-клеток в культуральной среде с добавлением низких концентраций IL-2, нами была разработана методика получения ЦИК-клеток. Для этого для культивирования МНК мы дополнительно использовали IL-15, который в большей степени влияет на активацию лимфоцитов-эффекторов.

Ранее нами было показано, что добавление IL-2 к культуральной среде стимулирует пролиферативную и функциональную противоопухолевую активность лимфоцитов, а также увеличивает продукцию некоторых цитокинов и поверхностную экспрессию маркеров активации лимфоцитов с 3-го дня культивирования [21].

При добавлении IL-15 к культуральной среде пролиферация лимфоцитов в первые 3 суток культивирования была достоверно выше, чем в среде с одним IL-2 (рис. 1). При дальнейшем культивировании к 6–7-му дню активации наблюдалось незначительное увеличение пролиферативной активности, которое составило в среднем около 20%, а к 14-му дню количество клеток увеличивалось на 100%, то есть произошло удвоение популяции, чего не было достигнуто в среде с IL-2.

При использовании комбинации цитокинов отмечено, что жизнеспособность культивируемых клеток в суспензии несколько снижалась, на 3-й день в среднем составляла $100,0 \pm 0,7\%$, на 7-й день – $96,0 \pm 2,6\%$, к 10-му дню достигла $93,0 \pm 2,2\%$, а к 14-му дню – $89,0 \pm 5,2\%$. Как было показано, жизнеспособность клеток в среде с IL-2 была несколько ниже. Так, на 3-й день она в среднем составляла $98,0 \pm 1,5\%$, на 7-й день снизилась до $93,0 \pm 2,0\%$, на 10-й день была около $89,0 \pm 3,0\%$, а на 14-й день уменьшилась до $81,0 \pm 4,8\%$ ($p < 0,05$). По всей видимости, IL-15 обладает не только стимулирующим влиянием на пролиферацию лимфоцитов, но и способствует увеличению жизнеспособности клеток.

При выращивании МНК было замечено, что лимфоциты в среде с двумя цитокинами начинают терять

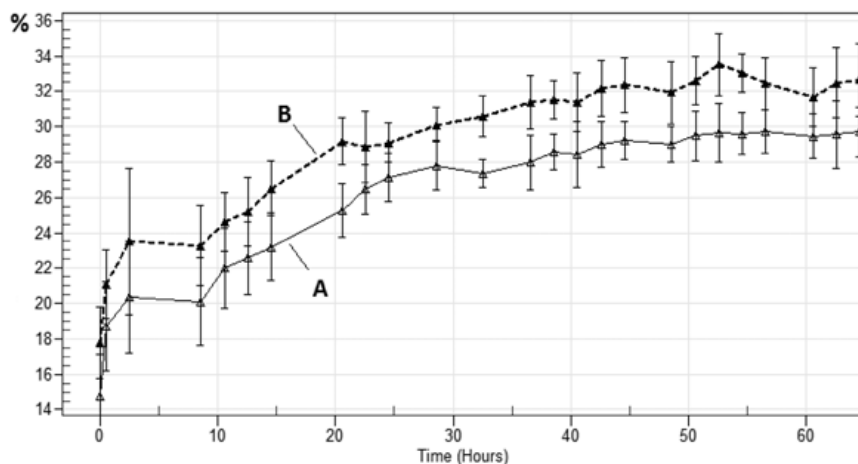


Рисунок 1. Влияние IL-2 и IL-15 на пролиферативную активность лимфоцитов после инкубации. А – с IL-2. В – с IL-2, IL-15.

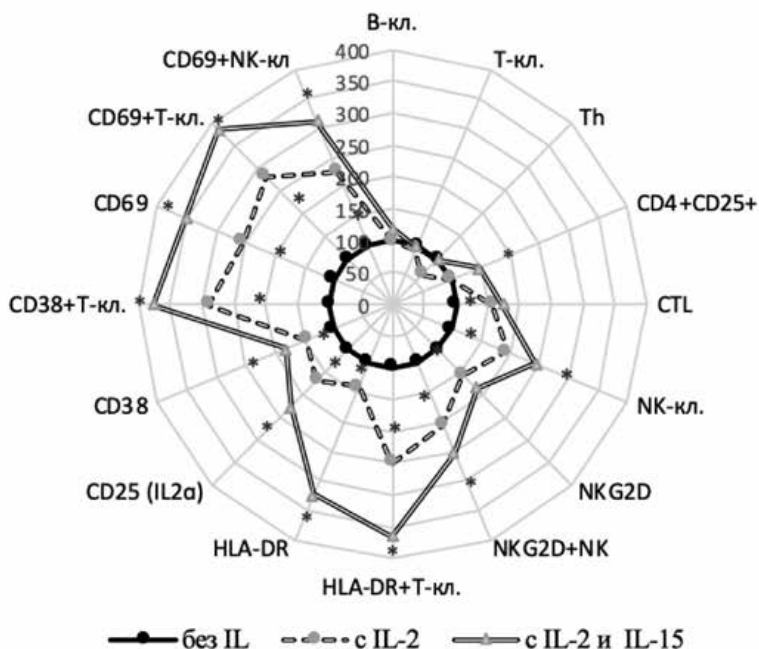


Рисунок 2. Изменение поверхностной экспрессии маркеров активации на культивируемых лимфоцитах сразу после выделения (100%) и через 3 дня в среде с одним IL-2 и при совместном культивировании с IL-2 и IL-15. Примечание: * – различия показателей статистически достоверны ($p < 0,05$).

адгезионные свойства только после 10-го дня культивирования, а в среде с одним IL-2 – уже после 7-го дня, что является неблагоприятным признаком для клеток в процессе выращивания. Переход клеток в суспензию может означать окончание процесса активации данного вида клеток.

При культивировании клеток в среде с двумя цитокинами, по сравнению с добавлением только IL-2, было выявлено, что в процессе активации в данных условиях происходит незначительное перераспределение клеточных субпопуляций. Количество В- и Т-лимфоцитов незначительно уменьшается к 14-му дню культивирования. Однако значимо (на 49,4%) увеличивается количество НК-клеток и активированных лимфоцитов, среди которых в большей степени увеличилась экспрессия HLA-DR (на 183,3%), CD69 (на 97,1%), CD25 (на 58%) и в меньшей степени, но значимо, увеличилась экспрессия CD38 (на 37,9%) и NKG2D (на 28,9%) ($p < 0,05$) (рис. 2).

В пуле активированных ЦЛ доля $CD25^+$ -клеток максимально возростала (в 1,7 раза) только к 14-му дню. Количество НК-клеток к 5-му дню возростало в 1,4 раза и составляло в среднем $41,3 \pm 19,0$ против $32,9 \pm 11,0\%$

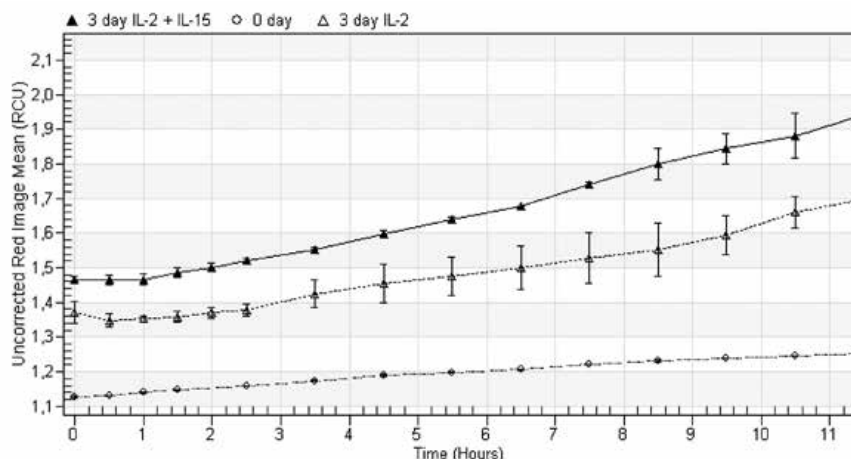


Рисунок 3. Увеличение количества мертвых клеток-мишеней (красная флуоресценция Ethd-1) после инкубации с лимфоцитами больного меланомой без активации (0-й день) и через 3 дня культивирования в средах с IL-2 и в комбинации IL-2 и IL-15 (соотношение мишеней и эффекторов равно 1:20).

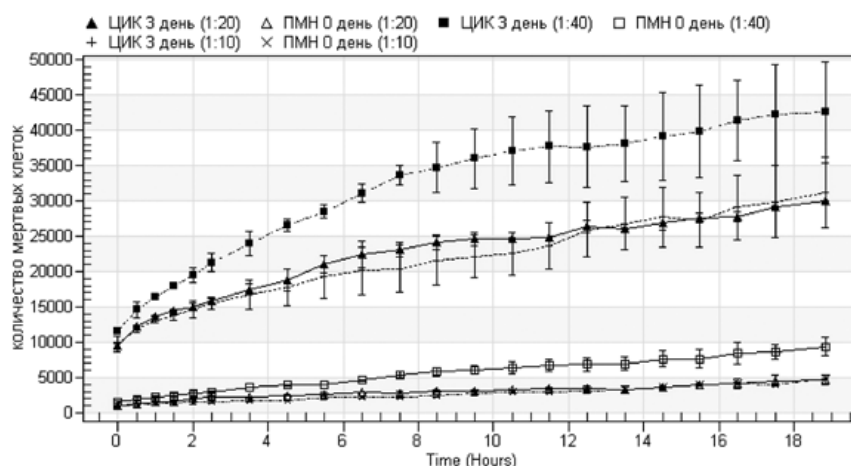


Рисунок 4. Цитотоксическая активность лимфоцитов больных без активации и через 3 дня культивирования в различных соотношениях мишеней и эффекторов.

в среде только с IL-2. Количество CD4⁺CD25⁺ увеличивалось к 14-му дню в 1,7 раза. Следует отметить, что доля Treg не изменилась на протяжении всего времени культивирования в данных условиях как с IL-2, так и с двумя интерлейкинами, что подтверждает данные других исследователей [22]. Доля цитотоксических Т-лимфоцитов незначительно увеличилась в среднем с $37,4 \pm 8,9$ до $41,2 \pm 20,0$ % по сравнению с культивированием в среде только с IL-2.

Количество НКТ-клеток в большей степени начинало увеличиваться уже после 3-го дня культивирования в среде с двумя интерлейкинами. К 6-му дню их доля составляла в среднем 14 %. Увеличение количества и активация НКТ-клеток может значительно усилить их цитотоксический потенциал. Учитывая их функциональные особенности, эти эффекторные клетки тоже могут быть использованы для целей АИТ злокачественных новообразований [23].

Таким образом, доля лимфоцитов, обладающих цитотоксической активностью (НК-, цитотоксических Т-лимфоцитов и НКТ-лимфоцитов) в популяции активированных МНК составила более 80 %. Было показано, что при добавлении двух интерлейкинов лимфоциты активируются *in vitro* в большей степени между 3-м и 5-м днями культивирования. Содержание маркера ранней активации CD69 начинает в несколько раз увеличиваться на всех лимфоцитах и на НК-клетках на 3-й день культивирования. Содержание

раннего активационного маркера CD38 после 5-го дня культивирования на всех лимфоцитах возрастает в два раза, а на Т-клетках – в 3,5 раза. Количество всех активированных HLA-DR⁺-клеток к 6-му дню увеличивалось в два раза. Тенденция к повышению экспрессии поздних активационных маркеров сохраняется до 14-го дня культивирования.

В работе была проведена оценка цитотоксической активности лимфоцитов на 3-й день культивирования в среде с IL-2 и IL-15 в различных соотношениях мишеней и эффекторов. На рисунке 3 представлены данные интенсивности флуоресценции клеток-мишеней, окрашенных в красный цвет, по включению Ethd-1 за счет перфорации мембраны, вызванной цитотоксической активностью лимфоцитов без активации (0-й день) и на 3-й день после культивирования в различных средах. Показано, что спонтанный цитолиз ЛАК-клеток в среде с IL-2 достоверно выше увеличился в среднем на 28 % по сравнению с не активированными лимфоцитами ($p < 0,05$), а активность ЦИК-клеток – в 1,5 раза выше, чем неактивированных лимфоцитов, и достоверно выше, чем при культивировании МНК только с IL-2 ($p < 0,05$) (рис. 3).

Оценивая функциональную активность ЦИК-клеток в различных соотношениях, было показано, что цитотоксическая активность нативных лимфоцитов начинала возрастать после 5–10 часов культивирования и достигала максимума через 15 часов. При соотношении мишеней и эффекторов 1:10 и 1:20 количество мертвых клеток-мишеней практически не отличалось и составляло 63–68 %. Наибольшей цитотоксической активностью (более 90 %) обладали ЦИК-клетки больных после 3 дней активации и инкубации с клетками-мишенями в соотношении 1:40 (рис. 4).

Таким образом, наглядно продемонстрировано, что ЦИК-клетки обладают большей функциональной активностью по сравнению с ЛАК-клетками. Цитотоксичность в данном случае была в восемь раз выше, чем у неактивированных клеток.

Оценивая эффекторную функцию ЦИК-клеток через разные промежутки времени после активации, было выявлено, что через 24 часа после активации наблюдается стремительный рост цитотоксической активности, который достигает максимальных значений через 42 часа, а наибольшей цитотоксичностью обладают лимфоциты на 5-й день культивирования в ППС с цитокинами. Этот эффект сохраняется на 7-й день после начала культивирования. Хотя морфология лимфоцитов при данных условиях культивирования изменяется начиная уже с 3-го дня активации.

Показано, что в культуре лимфоцитов при данных способах культивирования больший прирост численности и активация эффекторных функций проявляется именно у цитотоксических лимфоцитов (более 80%), которые и могут быть использованы для АИТ.

Проведен сравнительный анализ пролиферативной активности, жизнеспособности и функциональных характеристик клеточной субпопуляции МНК больных меланомой, культивированных *in vitro* в присутствии только IL-2 или при добавлении комбинации цитокинов IL-2 и IL-15. Экспериментально подтверждено, что для получения большего количества активированных ЦЛ, обладающих увеличенной цитотоксической активностью и высокой жизнеспособностью, целесообразно выбирать полную питательную среду с добавлением двух указанных интерлейкинов.

Обсуждение

Сравнение различных протоколов культивирования лимфоцитов-эффекторов в деталях является сложным, поскольку они чрезвычайно гетерогенны [3, 12, 24]. Продолжительность культивирования *ex vivo* колеблется от нескольких часов при быстрой активации клеток до нескольких недель при долгосрочном культивировании. Используются многочисленные исходные компоненты сред с различной долей НК-клеток, комбинации нескольких цитокинов в разных концентрациях. Также НК-клетки часто культивируют в комбинации с так называемыми клетками-кормицами (*англ.* feeder cells). Тем не менее разные способы получения НК-клеток *ex vivo* демонстрируют некоторые общие характеристики.

В последние годы несколько цитокинов широко изучались как потенциальные терапевтические агенты для манипуляции иммунным ответом против злокачественных клеток из-за их способности стимулировать рост и выживание клеток, а также для увеличения цитотоксичности или производства цитокинов для повышения иммунной реактивности. До сих пор лишь небольшое количество цитокинов достигало клинических испытаний. Среди этих цитокинов, протестированных в разных установках *in vitro* и *in vivo*, должны быть выделены IL-2 и IL-15 [3, 24]. Они структурно связаны и имеют перекрестные функции, включая роль в пролиферации Т- и НК-клеток, стимулирование цитотоксической дифференцировки, продуцирование цитокинов и активации.

Некоторыми авторами описано, что IL-15, в отличие от IL-2, обладает более широким спектром биологических эффектов не только на НК-клетки, но и на Т-клетки, увеличивая их пролиферацию и регулируя апоптоз Т-клеток памяти [25, 26]. Показано, что, по сравнению с ЛАК-клетками, ЦИК-клетки оказывают высокую противоопухолевую активность у мышей [19]. В одном из зарубежных клинических исследований NCT01021059 показано, что именно IL-15 обладает увеличенной способностью к экспансии НК-клеток и CTL, за счет чего обеспечивается противоопухолевый эффект [27].

Заключение

Применение небольших концентраций IL-15 и IL-2 в готовой к употреблению среде без сыворотки является эффективным способом активации субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток. Подходы, основанные на использовании среды с комбинацией цитокинов, могут быть рекомендованы для долгосрочного культивирования лимфоцитов и для эскалации активированных клеток. В настоящей работе представлена комплексная морфологическая, иммунофенотипическая и функциональная характеристика АЦЛ, используемых для АИТ.

Результаты данной части работы позволили разработать метод получения культуры ЦИК-лимфоцитов с высокой жизнеспособностью, пролиферативной и противоопухолевой активностью.

Предлагаемый способ культивирования МНК позволяет получить достаточное количество активированных цитотоксических лимфоцитов с высокой функциональной активностью и жизнеспособностью и может быть рекомендован для адоптивной иммунотерапии больных раком.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ООО «Квадрос-Био» за предоставленное оборудование, программное обеспечение и осуществление качественной технической поддержки при проведении исследования.

Список литературы / References

1. Shin M.H., Kim J., Lim S.A., et al. NK cell-based immunotherapies in cancer. *Immune Netw.* 2020; 20 (2). <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e14>
2. Абакушина Е.В., Козлов И.Г. Иммуноterapia с использованием естественных киллеров в лечении онкологических заболеваний. *Российский иммунологический журнал.* 2016; 10 (19), № 2: 131–142. Abakushina E. V., Kozlov I. G. Immunotherapy with natural killer cells in the treatment of cancer. *Russian Journal of Immunology.* 2016; 10 (19), No. 2: 131–142.
3. Hofer E., Koehl U. Natural killer cell-based cancer immunotherapies: from immune evasion to promising targeted cellular therapies. *Frontiers in Immunology.* 2017; 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00745>
4. Hu W., Wang G., Huang D., et al. Cancer immunotherapy based on natural killer cells: current progress and new opportunities. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1205. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01205>
5. Dahlberg C.L., Sarhan D., Chrobok M., et al. Natural Killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity. *Frontiers in Immunology.* 2015; 6: 605. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00605>
6. Zhang C., Hu Y., Shi C. Targeting Natural Killer cells for tumor immunotherapy. *Front. Immunol.* 2020; 11: 60. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00060>
7. Abakushina E. V., Gelm Yu.V., Pasova I. A., Bazhin A. V. Immunotherapeutic approaches for the treatment of colorectal cancer. *Biochemistry (Moscow).* 2019; 84 (7): 720–728. <https://doi.org/10.1134/S0006297919070046>

8. 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. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019; 167 (4): 486–491. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04556-3>
9. Кит О.И., Кириченко Е.Ю., Новикова И.А. и соавт. Иммуноterapia колоректального рака: современное состояние и перспективы (обзор). *Современные технологии в медицине*. 2017; 9 (3): 138–150. Kit O.I., Kirichenko E.Y., Novikova I.A., Maksimov A.Y., Filippova S.Y., Grankina A.O., Zlatnik E.Y. Colorectal Cancer Immunotherapy: Current State and Prospects (Review). *Modern Technologies in Medicine*. 2017; 9 (3): 138–150. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.3.18>
10. Miller J.S., Soignier Y. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005; 105 (8): 3051–3057. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2974>
11. Kmiecik J., Zimmer J., Cheskya M. Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *Neuro-Oncology*. 2014; 116 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1265-5>
12. Hashemi E., Malarkannan S. Tissue-resident NK cells: development, maturation, and clinical relevance. *Cancers (Basel)*. 2020; 12 (6): 1553. <https://doi.org/10.3390/cancers12061553>
13. Granzin M., Wagner J., Kohl U., et al. Shaping of Natural killer cell antitumor activity by ex vivo cultivation. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00458>
14. Dafni U., Michielin O., Llesmes SM, et al. Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant Interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2019; 30 (12): 1902–1913. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz398>
15. Wang K., Han Y., Cho W.C., Zhu H. The rise of human stem cell-derived natural killer cells for cancer immunotherapy. *Expert Opinion Biological Therapy*. 2019; 19 (2): 141–148. <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1559293>
16. Титов К.С., Демидов А.В., Киселевский М.В. и соавт. Интраплевральная ИЛ-2 иммунотерапия пациентов с метастатическими плевритами. *Российский онкологический журнал*. 2010; 4: 20–24. Titov K.S., Demidov A.V., Kiselevsky M.V., et al. Intrapleural IL-2 immunotherapy of patients with metastatic pleurisy. *Russian Journal of Oncology*. 2010; 4: 20–24.
17. Chen Z., Chen L., Baker K. et al. CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2011; 208 (13): 2633–40. <https://doi.org/10.1084/jem.20102575>
18. Sangiolo D., Martinuzzi E., Todorovic M., et al. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers. *Int Imm*. 2008; 20 (7): 841–848. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn042>
19. Wang F.S., Liu M.X., Zhang B., et al. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol*. 2002; 8 (3): 464–468. doi: 10.3748/wjg.v8.i3.464.
20. Oh S., Lee J.H., Kwack K., Choi S.W. Natural Killer cell therapy: a new treatment paradigm for solid tumors. *Cancers (Basel)*. 2019; 11 (10): 1534. <https://doi.org/10.3390/cancers11101534>
21. Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Kaprin A.D. Morphofunctional characteristics of human lymphocytes after in vitro activation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016; 161 (5): 731–735. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3496-x>
22. Чикилева И.О., Велижева Н.П., Шубина И.Ж., и соавт. Содержание Т-регуляторных лимфоцитов CD4+CD25+FOXP3+ в популяции лимфокин-активированных киллеров. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2008; 19 (3): 16–25. Chikileva I.O., Velizheva N.P., Shubina I.Zh., et al. Content of T-regulatory lymphocytes CD4+CD25+FOXP3+ in lymphokine-activated killer population. *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research*. 2008; 19, 3: 16–25.
23. Ахматова Н.К., Лебединская Е.А., Лебединская О.В., Киселевский М.В. Натуральные киллеры Т-клетки (НКТ), иммунофенотипическая и функциональная характеристика, активация, значение в практической медицине. *Российский иммунологический журнал*. 2007; 1 (10): 3–4: 195–206. Akhmatova N.K., Lebedinskaya E.A., Lebedinskaya O.V., Kiselevsky M.V. Natural Killer T (NKT) cells: immunophenotype, functional characteristics and significance in clinical practice. *Russian Journal of Immunology*. 2007; 1 (10): 3–4: 195–206.
24. Mao Y., van Hoef V., Zhang X., et al. Blood. IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. 2016; 128 (11). <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-698027>
25. Lin S.J., Lee P.T., Kuo M.L. Cytokine activation of natural killer cells. *Methods in molecular biology*. 2014; 1139: 223–229. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0345-0_19
26. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Дунец Н.А., Тодосенко Н.М., Шуплецова В.В., Литвинова Л.С. Влияние цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15), имеющих общую g-цепь рецепторов, на дифференцировку и созревание Т-клеток CD4+/CD8+ в популяции Т-лимфоцитов CD45RA in vitro. *Цитология*. 2017; 59 (5): 337–342. Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Dunets N.A., Todosenko N.M., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Effect of cytokines (IL-2, IL-7 and IL-15), having a common g-chain of receptors on differentiation and maturation of CD4+/CD8+ T-cells in a CD45RA T-lymphocytes population in vitro. *Cell and Tissue Biology*. 2017; 11 (5): 356–362.
27. Conlon K.C., Lugli E., Welles H.C., Rosenberg S.A., et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33 (1): 74–82. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.3329>

Статья поступила / Received 28.08.21
Получена после рецензирования / Revised 15.09.21
Принята в печать / Accepted 25.09.21

Сведения об авторах

Абакушина Елена Вячеславовна, д.м.н., с.н.с. лаборатории клинической иммунологии¹; проф. кафедры радионуклидной медицины отдела биотехнологий². E-mail: abakushina@mail.ru. Scopus: 15844847700. WoSResearcher: O-6947-2014. eLibrary: 594958. ORCID 0000-0002-3881-3221
Гельм Юлия Витальевна, н.с. лаборатории клинической иммунологии¹. E-mail: julia_marizina@mail.ru. Scopus: 57190795044. WoSResearcher: O-7325-2014. eLibrary: 751187. ORCID: 0000-0001-8673-3616
Лысюк Елена Юрьевна, к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии³. E-mail: elenlys@gmail.com. Scopus: 22135546600. WoSResearcher: G-2951-2017. eLibrary: 96321. ORCID: 0000-0002-4879-7958

¹Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, г. Обнинск

²Обнинский институт атомной энергетики – филиал ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Обнинск

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Автор для переписки: Абакушина Елена Вячеславовна. E-mail: abakushina@mail.ru

About authors

Abakushina Elena V., DM Sci (habil.), senior researcher of Laboratory of Clinical Immunology¹; prof. at Dept of Radionuclide Medicine, Dept of Biotechnology². E-mail: abakushina@mail.ru. Scopus: 15844847700. WoSResearcher: O-6947-2014. eLibrary: 594958. ORCID 0000-0002-3881-3221
Gel'm Yulia V., researcher of Laboratory of Clinical Immunology¹. E-mail: julia_marizina@mail.ru. Scopus: 57190795044. WoSResearcher: O-7325-2014. eLibrary: 751187. ORCID: 0000-0001-8673-3616
Lysyuk Elena Yu., PhD Bio Sci, senior researcher of Laboratory of Molecular Immunology³. E-mail: elenlys@gmail.com. Scopus: 22135546600. WoSResearcher: G-2951-2017. eLibrary: 96321. ORCID: 0000-0002-4879-7958

¹Medical Radiological Research Center n.a. A.F. Tsyb – a branch of Federal Medical and Biological Centre 'National Medical Research Centre for Radiology', Obninsk, Russia

²Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering – National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Obninsk, Russia

³National Medical Research Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachyov, Moscow, Russia

Corresponding author: Abakushina Elena V. E-mail: abakushina@mail.ru

Для цитирования: Абакушина Е.В., Гельм Ю.В., Лысюк Е.Ю. Активация лимфоцитов in vitro для иммунотерапии больных меланомой. *Медицинский алфавит*. 2021; (31): 13–18. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-31-13-18>

For citation: Abakushina E.V., Gel'm Yu. V., Lysyuk E. Yu. Activation of lymphocytes in vitro for immunotherapy of patients with melanoma. *Medical alphabet*. 2021; (31): 13–18. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-31-13-18>

