

Влияние интерлейкинов 2, 7, 15 на пролиферацию натуральных киллеров *in vitro*

А.О. Ситковская, Е.Ю. Златник, С.Ю. Филиппова, Е.С. Бондаренко, Л.Н. Ващенко, Э.Э. Кечеджиева, И.Р. Дашкова, Е.А. Андрейко, И.А. Новикова

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

Контакты: Анастасия Олеговна Ситковская grankina.anastasia@mail.ru

Введение. Актуальной задачей современной адоптивной иммунотерапии рака является подбор оптимального состава цитокинов для *ex vivo* стимуляции иммунокомпетентных клеток для последующего введения онкологическим больным.

Цель исследования. Изучение влияния интерлейкина (ИЛ) 2, 7, 15 и их комбинаций на пролиферацию натуральных киллеров больных раком молочной железы (РМЖ) *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом исследования послужили натуральные киллеры, выделенные методом магнитной сепарации из мононуклеарных клеток периферической крови 10 больных местно-распространенным РМЖ (II стадия). После сепарации клетки культивировали в концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток/мл в течение 10 сут в среде RPMI 1640 с добавлением цитокинов в концентрации 40 нг/мл каждого в 5 вариантах опыта: ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-7/ИЛ-15, ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15. На 10-е сутки культивирования проводили исследования фенотипа клеток и клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии. Для иммунофенотипирования клеток использовали моноклональные антитела к антигенам: CD3, CD16/56, CD45, CD4, CD19 и CD8. Для оценки ДНК использовали окрашивание клеток пропидиум йодидом.

Результаты. По окончании культивирования количество живых клеток в процентах от первоначального было достоверно выше, чем в контроле (45,9 %), в образцах ИЛ-2 (86,8 %) и ИЛ-7/ИЛ-15 (85,6 %), ИЛ-15 (76,4 %), ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 (75,8 %). Доля натуральных киллеров (CD16⁺CD56⁺) достоверно отличалась от контроля (18,2 %) в образцах ИЛ-2 (45,6 %), ИЛ-15 (39,9 %), ИЛ-7/ИЛ-15 (36,2 %), ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 (35,9 %). Доля натуральных киллеров Т-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) достоверно отличалась от контроля (0,4 %) в образцах ИЛ-2 (2,06 %), ИЛ-15 (2,2 %), ИЛ-7 (0,9 %), ИЛ-7/ИЛ-15 (1,26 %), ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 (2,46 %). Во всех опытных пробах также наблюдалось достоверное увеличение доли клеток в S-фазе и индекса пролиферации (G2/M + S).

Заключение. Максимальная стимуляция пролиферации натуральных киллеров, сепарированных из крови больных РМЖ, была получена при стимуляции *in vitro* ИЛ-15 и комбинациями γ с-цитокинов, включающих его.

Ключевые слова: натуральные киллеры, интерлейкины, рак молочной железы, иммуномагнитная сепарация, клеточный цикл

Для цитирования: Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Филиппова С.Ю. и др. Влияние интерлейкинов 2, 7, 15 на пролиферацию натуральных киллеров *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1): 56–66.

Effect of interleukins 2, 7, 15 on the proliferation of natural killers *in vitro*

Anastasia O. Sitkovskaya, Elena Yu. Zlatnik, Svetlana Yu. Filippova, Elena S. Bondarenko, Larisa N. Vaschenko, Emma E. Kechedzhieva, Irina R. Dashkova, Elena A. Andreiko, Inna A. Novikova

National Medical Research Centre for Oncology; 63, 14 Liniya St., Rostov-on-Don 344000, Russia

Contacts: Anastasia Olegovna Sitkovskaya grankina.anastasia@mail.ru

Introduction. The actual task of modern adoptive cancer immunotherapy is the selection of the optimal composition of cytokines for *ex vivo* stimulation of immunocompetent cells for subsequent administration to oncological patients.

The purpose of the study was to compare the effect of interleukin (IL) 2, 7, 15 and their combinations on the proliferation of natural killer cells in breast cancer (BC) patients *in vitro*.

Materials and methods. The research was conducted on natural killer cells isolated by magnetic separation from mononuclear cells of peripheral blood of ten patients with locally advanced BC (stage II). After separation, the cells were cultured at a concentration of 2.5×10^5 cells/ml for 10 days in RPMI 1640 medium supplemented with cytokines at a concentration of 40 ng/ml each in five experimental variants: IL-2; IL-7; IL-15; IL-7/IL-15; IL-2/IL-7/IL-15. On the 10th day of cultivation, the phenotype of cells and the cell cycle were studied by flow cytometry. For immunophenotyping of cells, we used monoclonal antibodies to antigens: CD3, CD16/56, CD45, CD4, CD19, and CD8. For cell cycle study cells were stained with propidium iodide.

Results. On the final 10th day of cultivation the number of living cells expressed as percentage of the seeding numbers were significantly different from control (45.9 %) in samples IL-2 (86.8 %) and IL-7/IL-15 (85.6 %), IL-15 (76.4 %), IL-2/IL-7/IL-15 (75.8 %). The proportion of natural killers (CD16⁺CD56⁺) significantly differed from the control (18.2 %) in samples IL-2 (45.6 %), IL-15 (39.9 %), IL-7/IL-15 (36.2 %), IL-2/IL-7/IL-15 (35.9 %). The proportion of natural killer T cells (CD3⁺/CD16⁺CD56⁺) significantly differed from the control (0.4 %) in samples incubated with IL-2 (2.06 %), IL-15 (2.2 %), IL-7 (0.9 %), IL-7/IL-15 (1.26 %), IL-2/IL-7/IL-15 (2.46 %). All experimental tests also showed a significant increase in the proportion of cells in the S-phase and increase in the proliferation index (G2/M + S).

Conclusion. The maximum stimulation of the proliferation of natural killer cells isolated from the blood of patients with BC *in vitro* was obtained by stimulation with IL-15 alone and in combinations with γ -cytokines.

Key words: natural killer cells, interleukins, breast cancer, immunomagnetic separation, cell cycle

For citation: Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Filippova S.Yu. et al. Effect of interleukins 2, 7, 15 on the proliferation of natural killers *in vitro*. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(1):56–66. (In Russ.).

Введение

Существуют различные способы терапии онкологических заболеваний, в том числе такие агрессивные, как применение химиотерапевтических препаратов и лучевая терапия [1]. Одним из шадящих методов является иммунотерапия, направленная на корректировку нарушений различных этапов иммунного ответа, возникающих при развитии злокачественной опухоли [2]. В настоящее время широко известна адоптивная иммунотерапия, в основе которой лежит применение аутологичных/аллогенных, стимулированных *ex vivo* иммунокомпетентных клеток (Т-, В- и НК-клеток) [3]. Подобные исследования проводятся и в нашем центре [4, 5].

Еще в 80-х годах XX в. в качестве терапии больных с солидными опухолями на терминальных стадиях, проявляющих резистентность к остальным видам лечения, применяли лимфокин-активированные киллеры (ЛАК) в сочетании с одномоментным введением интерлейкина (ИЛ) 2 [6, 7].

Одна из знаменательных работ по ЛАК-терапии проведена в 1997 г., когда в ходе III фазы рандомизированного клинического исследования с участием 174 первичных пациентов с карциномой легкого больным вводили аутологичные ЛАК ($1-5 \times 10^9$ клеток/инъекция) в сочетании с ИЛ-2 до или после стандартной противоопухолевой терапии в интервале 2–3 мес в течение 2 лет. По результатам исследования 5- и 9-летняя выживаемость больных составила 54,5

и 52,0 % соответственно в сравнении с 33,4 и 24,2 % в контрольной группе, где не применяли иммунотерапию ($p < 0,001$) [8].

Ранее мы изучили влияние различных концентраций ИЛ-2 и интерферона γ на пролиферацию и иммунофенотип лимфоцитов, полученных от больных местно-распространенным раком молочной железы (РМЖ) (II–III стадия) после иммуномагнитной деплеции Т-регуляторных клеток из общего пула лимфоцитов *in vitro* [9]. В итоге предварительное снижение доли Т-регуляторных клеток перед стимуляцией лимфоцитов не произвело должного эффекта, поэтому применение деплеции в подобном методическом режиме не привело к значимым результатам. Однако были обнаружены некоторые различия в динамике натуральных киллеров (НК) и натуральных киллеров Т-клеток (НКТ) в зависимости от цитокинов, воздействующих на клетки.

В работе М.В. Киселевского и соавт. [3] подробно раскрыты роль ряда ИЛ и перспективы их применения в иммунотерапии злокачественных новообразований. В частности, авторы обсуждают индукцию пролиферации и активации иммунных клеток через рецептор ИЛ-2, ссылаясь на исследование F. André и соавт., проведенное в 2012 г. [10]. Также рассматривается возможность применения в качестве компонента адоптивной иммунотерапии ИЛ-15, одиночно и в сочетании с ИЛ-2, как утверждают авторы, – в качестве инструмента для усиления как гуморальных,

так и адаптивных противоопухолевых иммунных реакций. Предполагается, что активация Т- и НК-клеток с использованием цитокинов может обладать синергизмом с эффектом ингибиторов контрольных точек иммунитета [3]. А применение ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15 для индукции PD-1 не приводит к угнетению жизнеспособности и пролиферации лимфоцитов, при этом может ограничивать некоторые эффекторные функции Т-клеток и в дальнейшем препятствовать иммуноопосредованному повреждению нормальных тканей [11].

Несмотря на то что первые исследования индукции ЛАК-клеток насчитывают более 30 лет, в настоящее время работы в данной области продолжают, поскольку расширяются знания о функциях ИЛ. По современным представлениям, перспективным является использование для генерации ЛАК-клеток комплексов цитокинов. Поскольку ЛАК могут происходить не только из НК, но и из НКТ-клеток, кроме традиционного ИЛ-2 предложено использовать стимуляторы Т-лимфоцитов ИЛ-7 и НК-клеток ИЛ-15. ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15 имеют общую γ -цепь (благодаря чему получили название семейства $\gamma\epsilon$), что позволяет им осуществлять свои функции через активацию сигнального пути JAK/STAT, вследствие этого активность данных цитокинов во многом перекрывается, тем не менее каждый из них играет свою биологическую роль [12]. Так, ИЛ-7 и ИЛ-15 играют важную, хотя и не исключительную, роль в формировании и выживании Т-клеток памяти. Гетерогенность субпопуляций НК также предполагает их различную чувствительность к разным цитокинам. Например, CD16⁻CD56⁺-НК-клетки могут вызывать экспрессию pSTAT5 в ответ как на ИЛ-7, так и на ИЛ-15 *in vitro*, тогда как CD16⁺CD56⁻-НК-клетки отвечают только на ИЛ-15. ИЛ-2 и ИЛ-15, действующие на один β -рецептор (CD122), участвуют в инициальном Т-клеточном ответе на антиген, а также вызывают активацию и пролиферацию НК-клеток и усиливают их цитолитическую активность, реализуемую перфорин и гранзимом В.

Важным этапом генерации ЛАК-клеток является экспансия, для которой предлагаются различные протоколы, в том числе без использования фидерных клеток, а с помощью обработки НК-лимфоцитов ИЛ-15 и ИЛ-21 [13]. Последний тоже относится к $\gamma\epsilon$ -цитокинам и не только вызывает увеличение количества НК, но и усиливает их созревание и функциональную активность.

Уточнение значения цитокинов, применяемых в комплексе для стимуляции, и их взаимодействия представляется важным для разработки методов противоопухолевой клеточной иммунотерапии.

Цель настоящей работы – изучить влияние ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и их комбинаций на пролиферацию НК

больных местно-распространенным РМЖ (II стадия) после иммуномагнитной сепарации данных клеток из общего пула лимфоцитов *in vitro*.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК). Материалом являлась периферическая кровь 10 больных РМЖ II стадии, проходивших лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России в отделении опухолей костей, кожи, мягких тканей и молочной железы. Забор крови проводили из локтевой вены в объеме 32 мл в пробирки с фикалом для выделения МНК (BD Vacutainer® СРТ™, США, градиент плотности 1.077). Далее выделяли МНК и обогащали клеточную суспензию НК путем иммуномагнитной сепарации колоночным методом, как описано ниже.

Негативная сепарация НК из МНК. Суспензию МНК центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Добавляли 3 мл буфера для сепарации (1 часть бычьего сывороточного альбумина + 20 частей промывочного раствора) к осадку клеток и считали их общее количество на автоматическом счетчике клеток EVE (NanoEnTek, Корея) с окрашиванием 0,4 % трипановым синим. После подсчета клеток центрифугировали клеточную суспензию при 300 g в течение 10 мин. В зависимости от количества клеток добавляли 40 мкл буфера для сепарации и 10 мкл связанных с биотином антител (NK Cell Biotin-Antibody Cocktail, human (кат. № 130-092-657), Miltenyi Biotec, США) на каждые 10^7 клеток. Ресуспендировали осадок клеток и инкубировали в течение 5 мин при температуре 2–8 °С. Добавляли 30 мкл буфера для сепарации и 20 мкл антибиотинных микрочастиц на каждые 10^7 клеток, пипетировали и инкубировали 10 мин при температуре 2–8 °С. Доводили общий объем суспензии до 500 мкл буфером для сепарации и переносили на предварительно промытую 3 мл буфера для сепарации LS-колонку (LS Columns (кат. № 130-042-401), Miltenyi Biotec, США), помещенную в магнитное поле сепаратора (Mini&MidiMACS Starting Kit (кат. № 130-042-501), Miltenyi Biotec, США). Под колонкой располагали коллектор для эффлюента, представляющий собой чистую пробирку объемом 15 мл. После прохождения суспензии однократно промывали колонку 3 мл буфера для сепарации. Эффлюент, содержащий немеченые клетки (фракция, обогащенная НК-клетками), центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 500 мкл питательной среды RPMI 1640 («Биолот», Россия) и определяли общее количество клеток на автоматическом счетчике EVE. Часть клеток отбирали в отдельную микропробирку для дальнейшей точной цитометрии.

Культуральный этап. После сепарации клетки пасировали в равной посевной дозе по 5×10^5 клеток/лунка в 6-луночный планшет (Biofil, Китай). Клетки культивировали в питательной среде RPMI 1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки («Биолот», Россия) в течение 10 сут. В опытные лунки добавляли от 1 до 3 цитокинов в концентрации 40 нг/мл каждого: ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-7/ИЛ-15, ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15. Исследование проводилось с отрицательным контролем: НК после сепарации без воздействия цитокинами. Подсчет жизнеспособных клеток в опытных и контрольных образцах производили на 2, 3, 4, 5, 8, 9 и 10-е сутки после внесения цитокинов на автоматическом счетчике EVE с применением 0,4 % трипанового синего.

Имунофенотипирование клеток. Исследование фенотипа клеток проводили на этапе выделения МНК и на 10-е (итоговые) сутки после внесения цитокинов в опытные образцы на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием панели моноклональных антител к человеческим антигенам: CD3 (FITC), CD16/56 (PE), CD45 (PerCP-Cy5-5), CD4 (PE-Cy7), CD19 (APC), CD8 (APC-Cy7) (Becton Dickinson, США).

Исследование клеточного цикла. Исследование клеточного цикла проводили на 10-е сутки после культивирования с цитокинами. Для оценки ДНК в исследуемых клетках использовали CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit (кат. № 340242, Becton Dickinson, США). Анализ образцов (не менее 20 000 клеток) после окрашивания пропидиум йодидом проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II, оборудованном модулем дискриминации дуплетов. Тестирование работы проточного цитофлуориметра проводили с использованием универсальных биологических частиц DNA QC Particles (кат. № 349523, Becton Dickinson, США). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ModFIT LT. Долю клеток с различным содержанием ДНК на гистограммах рассчитывали как процент от общего числа проанализированных клеток. Долю клеток в разных фазах клеточного цикла выражали в процентах.

Метод основан на растворении липидов клеточной мембраны неионным детергентом, разрушении клеточного цитоскелета и протеинов ядра трипсином, расщеплении клеточной РНК ферментом, и стабилизации ядерного хроматина спермином. Пропидиум йодид окрашивает хроматин; затем проводится измерение на проточном цитометре, обеспечивающем дискриминацию дуплетов. Ядра, окрашенные пропидиум йодидом, испускают свет с длиной волны от 580 до 650 нм. Детектор флуоресценции 2 (FL2) проточного цитофлуориметра, снабженный фильтром 585/42, используется для анализа эмиссии света,

испущенного окрашенными клетками в диапазоне от 564 до 606 нм.

Полученные гистограммы флуоресценции предоставляют информацию о клетках с анеуплоидным содержанием ДНК. ДНК-индекс определяется делением среднего значения относительного содержания ДНК анеуплоидной популяции клеток в фазе G0/G1 на среднее значение G0/G1 нормальной популяции. Коэффициент вариации для каждого пика G0/G1 отображается в отчете.

Статистический анализ. Оценку статистической достоверности различий в показателях между группами определяли по *t*-критерию Стьюдента. Данные выражали как средние значения \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Кратность выборки составила 16, так как некоторые образцы выполняли в нескольких повторах.

Результаты и обсуждение

Культуральный этап. Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о ряде статистически достоверных различий между опытными и контрольными пробами в разные сутки культивирования. Так, на 5-е сутки культивирования суспензии клеток под воздействием цитокинов количество клеток, выраженное в процентах от начального количества, было больше по сравнению с контролем (64,1 %) в образцах с ИЛ-2 (97,2 %) и ИЛ-7/ИЛ-15 (91,7 %) – в 1,5 и 1,4 раза соответственно ($p < 0,05$). После 9 сут культивирования статистически значимое превышение количества клеток по сравнению с контрольным образцом (54,9 %) наблюдали в образцах с ИЛ-2 (86,2 %) – в 1,6 раза; ИЛ-15 (84,1 %) и ИЛ-7/ИЛ-15 (84,4 %) – в 1,5 раза ($p < 0,05$).

В целом внесение цитокинов в образцы, обогащенные НК-клетками, приводило к повышению доли этих клеток, что, несомненно, связано с индукцией их пролиферации. При этом добавление ИЛ-7 в образцы с НК способствовало постепенному угнетению числа клеток и в последние 3 дня исследования показатели опускались ниже контрольных (рис. 1).

Таким образом, самостоятельное воздействие ИЛ-7 привело к негативному эффекту на пролиферацию НК. Сочетанное действие ИЛ-7/ИЛ-15 наряду с ИЛ-2 показало наилучшие результаты на 10-е сутки культивирования. Внесение остальных цитокинов в индивидуальном порядке либо в комбинации приводило к сходному стимулирующему эффекту.

Имунофенотипирование клеток. Анализ полученных данных выявил ряд различий в экспрессии мембранных рецепторов НК- и НКТ-клеток в опытных и контрольных образцах. Культивирование клеток с комбинацией цитокинов ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 приводило к увеличению в 1,9 раза доли CD16⁺CD56⁺-клеток (НК) (35,9 %) в сравнении с контролем (18,2 %). Добавление в опытные образцы ИЛ-7/ИЛ-15 повышало

Таблица 1. Влияние различных цитокинов на пролиферацию исследуемых клеток *in vitro*Table 1. The influence of various cytokines on the proliferation of the studied cells *in vitro*

Цитокины Cytokines	Доля от первоначально внесенных клеток ($M \pm m$), % Percentage of originally introduced cells ($M \pm m$), %						
	2-е сутки 2 nd day	3-и сутки 3 rd day	4-е сутки 4 th day	5-е сутки 5 th day	8-е сутки 8 th day	9-е сутки 9 th day	10-е сутки 10 th day
Контроль Control	117,7 ± 11,5	105,7 ± 13,4	88,8 ± 9,7	64,1 ± 8,4	65,9 ± 8,1	54,9 ± 7,2	45,9 ± 7,0
ИЛ-2 IL-2	118,6 ± 7,9	109,6 ± 10,0	113,2 ± 9,2	97,2 ± 5,4*	73,6 ± 6,9	86,2 ± 7,3*	86,8 ± 7,8*
ИЛ-7 IL-7	110,2 ± 6,5	99,8 ± 7,4	99,4 ± 6,2	71,6 ± 4,7	57,7 ± 7,9	42,7 ± 5,0	39,6 ± 7,6
ИЛ-15 IL-15	110,6 ± 7,6	99,7 ± 8,2	91,3 ± 6,4	78,8 ± 5,0	68,8 ± 6,2	84,1 ± 5,4*	76,4 ± 10,8*
ИЛ-7/ИЛ-15 IL-7/IL-15	110,9 ± 9,2	97,3 ± 6,7	91,8 ± 6,0	91,7 ± 5,2*	77,1 ± 6,5	84,4 ± 8,2*	85,6 ± 10,6*
ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 IL-2/IL-7/IL-15	102,7 ± 7,0	100,5 ± 8,6	89,5 ± 7,2	83,8 ± 6,5	77,1 ± 4,7	75,5 ± 9,2	75,8 ± 6,9*

*Достоверные отличия от контрольного образца ($p < 0,05$).

*Significant differences from the control sample ($p < 0.05$).

Примечание. Данные в таблице представлены в виде среднего значения (M) ± ошибка среднего значения (m). За 100 % принимали количество клеток при посеве – 5×10^5 клеток на лунку 6-луночного планшета.

Note. The data in the table are presented as an average value (M) ± error of the average (m). The number of cells at seeding was taken as 100 % – 5×10^5 cells per well of a 6-hole plate.

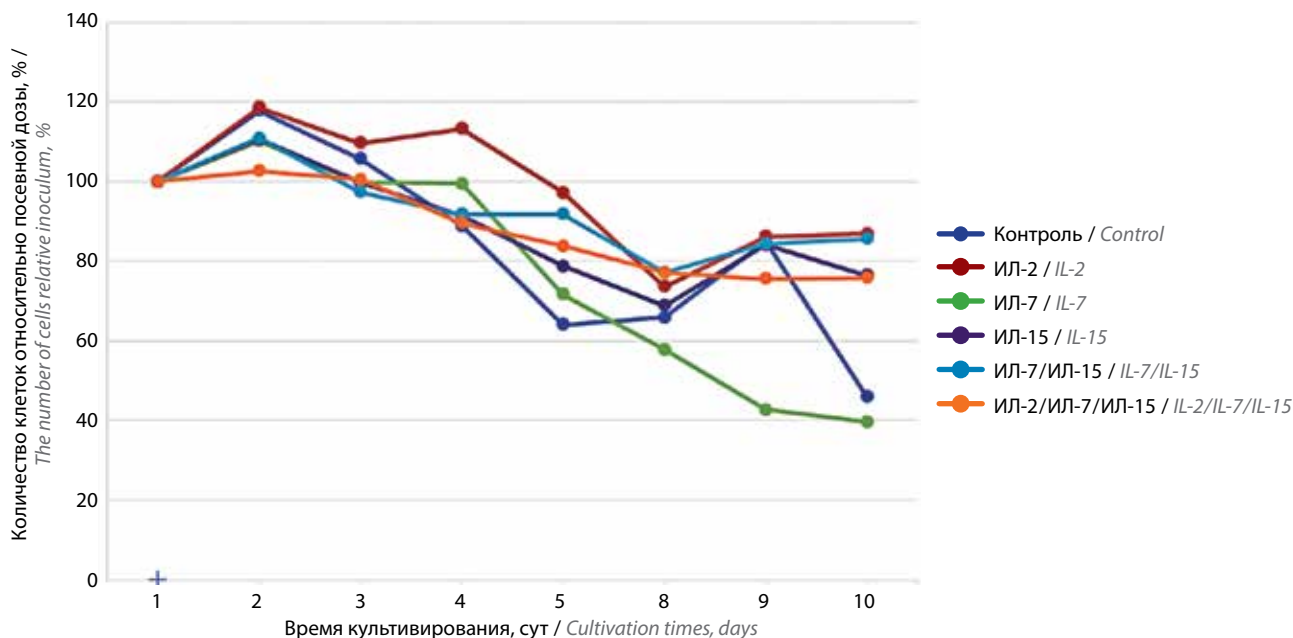


Рис. 1. Количество исследуемых клеток в процентах от первоначального значения по дням культивирования. Количество клеток в 1-й день культивирования соответствует посевной дозе и принимается за 100 %

Fig. 1. The number of studied cells as a percentage of the initial value for days of cultivation. The number of cells on the first day of cultivation corresponds to the inoculation dose and is taken as 100 %

уровень данной субпопуляции в 2 раза (36,2 %). Наибольшее количество CD16⁺CD56⁺-клеток, подтвержденное статистически, определяли в образцах с ИЛ-15

(39,9 %) – увеличение в 2,2 раза, и с ИЛ-2 (45,6 %) – увеличение в 2,5 раза ($p < 0,05$). При этом наличие в образце только ИЛ-7 приводило к уменьшению

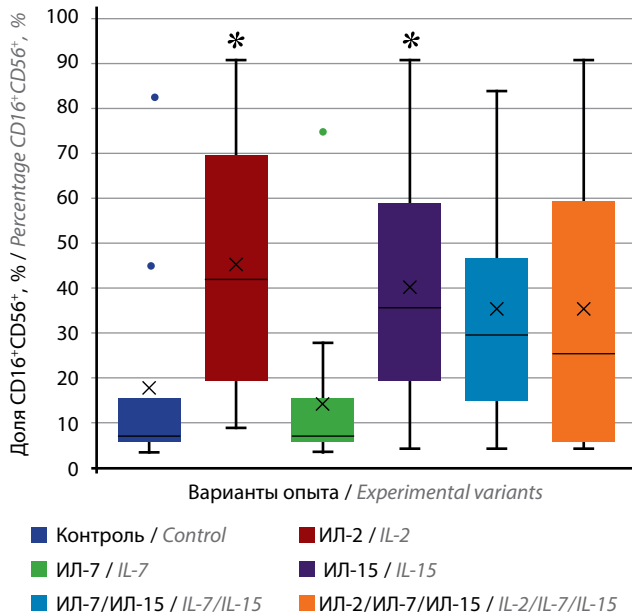


Рис. 2. Доля $CD16^+CD56^+$ -клеток через 10 сут сокультивирования с цитокинами. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контрольного образца ($p < 0,05$)

Fig. 2. The proportion of $CD16^+CD56^+$ -cells after 10 days of co-cultivation with cytokines. The asterisk marks significant differences from the control sample ($p < 0.05$)

уровня данных клеток (15,6 %) ниже контрольных значений в 1,2 раза (рис. 2).

Исследование уровня $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клеток (НКТ) выявило значительное повышение уровня данной субпопуляции в опытных образцах по сравнению с контролем, где он составлял 0,4 %. Так, при культивировании с ИЛ-7 доля клеток повышалась в 2,25 раза (до 0,9 %). Действие ИЛ-7/ИЛ-15 приводило к увеличению НКТ в 3,15 раза – до 1,26 % ($p < 0,05$). Как и при исследовании $CD16^+CD56^+$ -клеток, наиболее высокие значения $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клеток определялись при внесении ИЛ-2 и ИЛ-15. В 5,15 раза возрастала доля НКТ (2,06 %) после воздействия ИЛ-2 ($p < 0,05$), а добавление ИЛ-15 вызвало повышение их уровня до 2,2 %, т.е. в 5,5 раза ($p < 0,05$). Несмотря на слабое стимулирующее действие ИЛ-7 на пролиферацию НКТ, в комбинации с ИЛ-2 и ИЛ-15 (ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15) наблюдали прирост данных клеток (2,46 %) в 6,15 раза ($p < 0,05$) (рис. 3).

Различают 2 типа НКТ: инвариантные, выполняющие цитотоксическую функцию и распознающие гликолипидные антигены, связанные с молекулой CD1d – аналогом молекулы МНС; и НКТ II типа (большинство всех НКТ у человека) – продуценты цитокинов, осуществляющие регуляторную функцию при опухолевых и аутоиммунных заболеваниях [14]. Инвариантные НКТ экспрессируют только 1 вид Т-клеточного рецептора (TCR) α -цепи ($V\alpha 24J\alpha QTCR\alpha$),

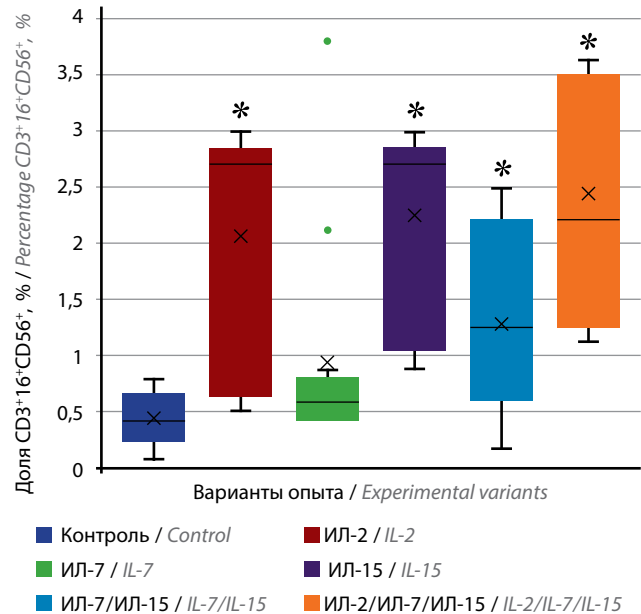


Рис. 3. Доля $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клеток через 10 сут сокультивирования с цитокинами. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контрольного образца ($p < 0,05$)

Fig. 3. The proportion of $CD3^+CD16^+CD56^+$ -cells after 10 days of co-cultivation with cytokines. The asterisk marks significant differences from the control sample ($p < 0.05$)

в отличие от НКТ II типа, экспрессирующих различные TCR α -цепи [15].

При острых тяжелых воспалительных процессах наблюдалось увеличение доли НКТ в периферической крови больных, которое сопровождалось снижением количества В-клеток и $CD3^+CD4^+$ -Т-хелперных лимфоцитов, что свидетельствовало о переходе воспаления в хроническую форму [16].

Во время развития злокачественной опухоли у больных отмечается угнетение инвариантных НКТ, при этом повышается уровень НКТ II типа. Подавление активности инвариантных НКТ клетками НКТ II типа связывают с прогрессированием опухолевого роста [17, 18].

В исследовании А.А. Боруновой и соавт. у всех больных метастатической меланомой кожи с повышенным содержанием НКТ в ходе иммунотерапии отмечали прогрессирование в период до 2 лет, однако прогрессирование отмечалось и у больных с нормальным содержанием НКТ [15]. В противоположность этому, увеличение популяции НКТ при других нозологических формах и ином противоопухолевом лечении, например химиотерапии, являлось благоприятным прогностическим критерием, как было установлено при исследовании больных РМЖ [19].

Функциональная гетерогенность НКТ, в частности их способность активировать и подавлять противоопухолевый иммунный ответ, предполагает возможность использования данной клеточной

субпопуляции в качестве модели клеточной терапии, а также прогностического критерия течения заболевания [20]. Несомненно, изучение субпопуляций НК, в частности НКТ, и путей их активации является важным аспектом иммунологических исследований при онкологических заболеваниях.

Исследование клеточного цикла. При исследовании индекса ДНК обнаружено, что клетки во всех пробах являлись диплоидными, что и предполагалось, так как лимфоциты являются стандартом диплоидных клеток при проведении данного теста (рис. 4). Анализ распределения клеток по фазам клеточного

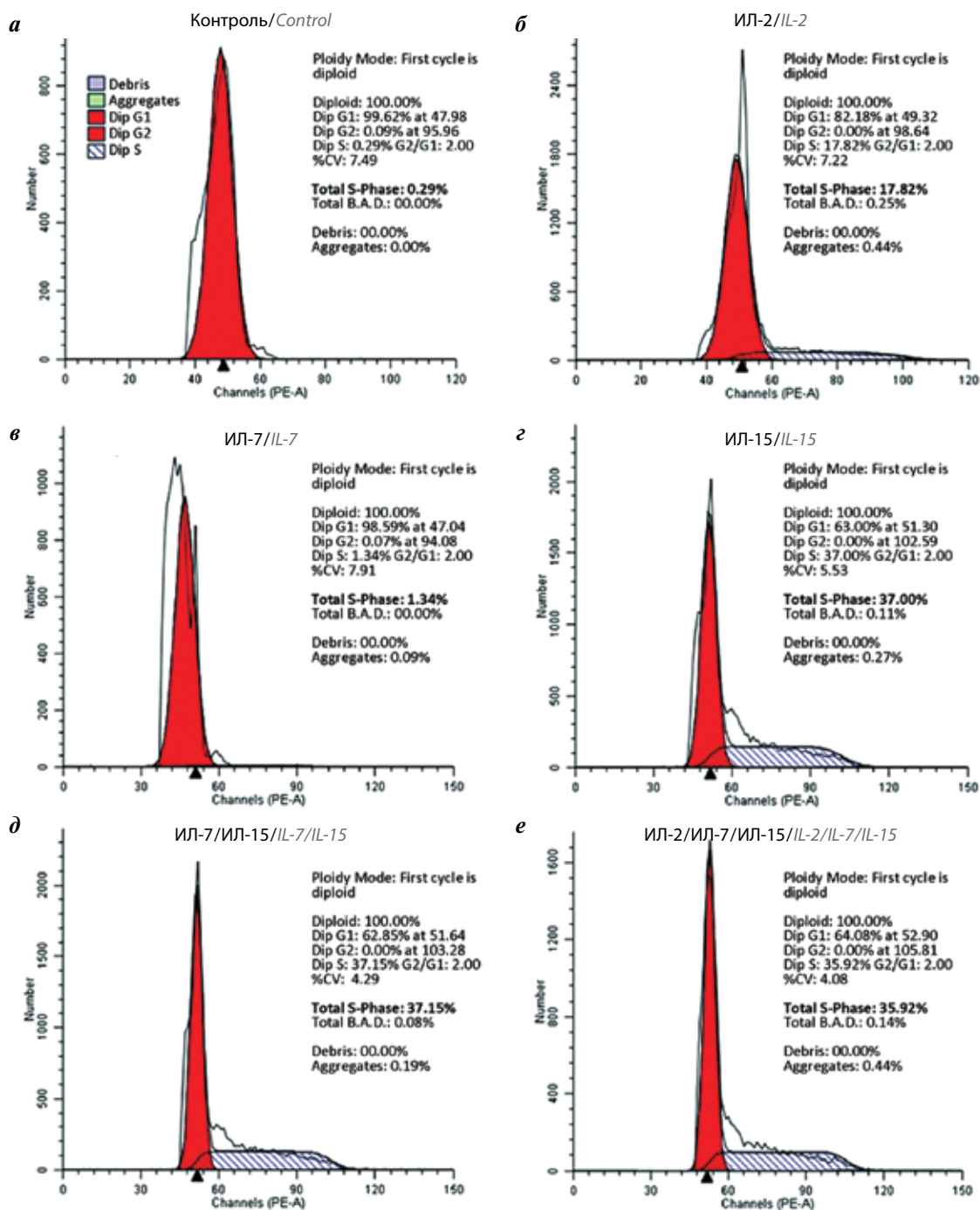


Рис. 4. Исследование клеточного цикла в образцах через 10 сут сокультивирования с цитокинами: а – контрольный образец; б – сокультивирование с ИЛ-2; в – сокультивирование с ИЛ-7; г – сокультивирование с ИЛ-15; д – сокультивирование с ИЛ-7/ИЛ-15; е – сокультивирование с ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15

Fig. 4. Study of the cell cycle in samples after 10 days of co-cultivation with cytokines: а – control sample; б – co-cultivation with IL-2; в – co-cultivation with IL-7; г – co-cultivation with IL-15; д – co-cultivation with IL-7/IL-15; е – co-cultivation with IL-2/IL-7/IL-15

Таблица 2. Анализ клеточного цикла исследуемых клеток после воздействия цитокинами

Table 2. Analysis of the cell cycle of the studied cells after effect of cytokines

Цитокины Cytokines	Доля от общего количества клеток ($M \pm m$), % Percentage of the total number of cells ($M \pm m$), %			ИП = G2/M + S IP = G2/M + S
	G0/G1-фаза G0/G1-phase	G2/M-фаза G2/M-phase	S-фаза S-phase	
Контроль Control	99,77 ± 0,19	0,03 ± 0,02	0,19 ± 0,19	0,22 ± 0,19
ИЛ-2 IL-2	78,61 ± 3,63*	0,14 ± 0,07	21,25 ± 3,65*	21,39 ± 3,63*
ИЛ-7 IL-7	97,45 ± 0,96*	0,18 ± 0,15	2,37 ± 1,02*	2,55 ± 0,96*
ИЛ-15 IL-15	70,92 ± 4,15*	0,28 ± 0,17	28,79 ± 4,29*	29,08 ± 4,15*
ИЛ-7/ИЛ-15 IL-7/IL-15	72,09 ± 3,32*	0,32 ± 0,17	27,58 ± 3,41*	27,90 ± 3,32*
ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 IL-2/IL-7/IL-15	75,58 ± 3,27*	0,27 ± 0,10*	24,15 ± 3,29*	24,42 ± 3,27*

*Достоверные отличия от контрольного образца ($p < 0,05$).

*Significant differences from the control sample ($p < 0,05$).

Примечание. Данные в таблице представлены в виде среднего значения (M) ± ошибка среднего значения (m). ИП – индекс пролиферации.

Note. The data in the table are presented as an average value (M) ± error of the average (m). IP is the index of proliferation.

цикла (табл. 2) установил, что в контроле основная масса клеток (99,77 %) находилась в G0/G1-фазе. Процентное соотношение клеток в G0/G1-фазе во всех опытных образцах статистически достоверно отличалось от контрольных проб. Минимальные различия были обнаружены после культивирования с ИЛ-7, доля таких клеток составляла 97,45 % и была меньше в 1,02 раза, чем в контроле ($p < 0,05$). В остальных опытных пробах наблюдали меньшее количество клеток в покоем состоянии. Добавление только ИЛ-2 приводило к снижению числа клеток в данной фазе по сравнению с контролем в 1,27 раза (до 78,61 %); комбинации ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 – в 1,32 раза (до 75,58 %); сочетанное воздействие ИЛ-7 и ИЛ-15 вызвало снижение количества покоящихся клеток в 1,38 раза (до 72,09 %), а воздействие только ИЛ-15 – в 1,41 раза (до 70,92 %) ($p < 0,05$).

Скорость пролиферации исследуемых клеток определяли по доле клеток в S-фазе. В контрольных пробах скорость пролиферации составила 0,19 %, что было значительно ниже данного показателя, регистрируемого во всех пробах с добавлением цитокинов. Различия между контролем и опытными образцами были статистически подтверждены. После культивирования исследуемых клеток с ИЛ-7 скорость пролиферации была больше в 12,5 раза (2,37 %) в сравнении с контролем ($p < 0,05$). Остальные опытные пробы превышали контрольные значения по данному показателю более чем в 100 раз. Разница между

контролем и пробой, культивированной с ИЛ-2, составила 111,8 раза, с ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 – 127,1 раза, с ИЛ-7/ИЛ-15 – 145,2 раза, максимальный показатель скорости пролиферации выявлен после культивирования с ИЛ-15 – 151,5 раза ($p < 0,05$).

Индекс пролиферации в исследуемых пробах оценивали по доле клеток в фазах G2/M + S. Уровень данного показателя также статистически достоверно различался между опытными пробами и контролем. Как и при оценке скорости пролиферации, минимальный индекс пролиферации клеток определяли в контроле (0,22 %). Добавление ИЛ-7 способствовало повышению данного показателя в 11,6 раза, составляя 2,55 % ($p < 0,05$), культивирование с ИЛ-2 – в 97,2 раза (21,39 %) ($p < 0,05$). Более чем в 100 раз увеличивались значения индекса пролиферации в сравнении с контролем при культивировании с ИЛ-15 в комбинации с другими цитокинами и без них (с ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 – 24,42 %, с ИЛ-7/ИЛ-15 – 27,90 %, с ИЛ-15 – 29,08 %) ($p < 0,05$).

Как известно, нормальные (не трансформированные) диплоидные клетки проходят через 4 фазы: G1, S, G2 и M. При отсутствии репликации диплоидные клетки находятся в покоем состоянии, или в фазе G0 клеточного цикла. ДНК содержится в парных хромосомах и ее количество соответствует 2C. На начальной стадии деления клетки вступают в фазу G1 клеточного цикла, где происходит синтез РНК и протеинов, при этом содержание ДНК равно

2С. Стадии G0 и G1 объединяют и обозначают как G0/G1, так как содержание ДНК в них одинаковое (2С). Синтез ДНК, или S-фаза, начинается с репликации молекул ДНК и продолжается до ее удвоения, содержание ДНК становится 4С. Далее клетки переходят в фазу G2, в которой происходит подготовка к делению; содержание ДНК при этом не изменяется и остается 4С. В процессе М-фазы клетки претерпевают деление, или митоз. Содержание ДНК остается 4С до тех пор, пока клетка не разделится на 2 дочерние клетки, в каждой из которых содержание ДНК будет 2С [21].

Фаза G2/М является 1 из 2 контрольных точек (чекпойнтов) клеточного цикла, используемых для мониторинга повреждений ДНК и ее восстановления [22]. Клетки, которые не проходят эту контрольную точку, демонстрируют накопление ДНК в фазе G2 и снижение в фазе М, называемое «арест G2/М» [23], что предотвращает митоз и тем самым ингибирует пролиферацию [24].

В результате исследования клеточного цикла мы установили способность исследуемых клеток к пролиферации после 10 сут культивирования с цитокинами. При этом в контрольных пробах без добавления цитокинов практически все клетки находились в состоянии покоя. Культивирование лимфоцитов периферической крови в течение 10 сут является длительным для данного типа клеток, и предполагает снижение способности к делению при отсутствии дополнительных стимулов. Известно, что митогенная стимуляция предполагает 3-дневное, а антигенная — 7-дневное культивирование [25, 26], хотя в последнем случае, поскольку исследуется специфический ответ, рассматривается пролиферация Т-лимфоцитов, а не НК. Длительность экспансии при культивировании НК составляет около 2 нед, а для цитокиновой стимуляции субпопуляции НК, подобных клеткам памяти, используется несколько циклов рестимуляции [27].

Согласно проведенному нами анализу клеточного цикла, максимальные значения уровня исследуемых клеток в фазе G2/М показаны в пробах с ИЛ-15, как при одиночном воздействии, так и в комбинации с другими цитокинами (ИЛ-7/ИЛ-15 и ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15). Судя по количеству клеток в S-фазе, максимальным стимулятором скорости пролиферации также оказался ИЛ-15; в меньшей степени скорость пролиферации усиливается и содержащими ИЛ-15 комбинациями цитокинов, примененными нами,

вероятно, за счет наличия в них ИЛ-7, угнетающего или, по крайней мере, не поддерживающего пролиферацию исследованных нами лимфоцитов.

Заключение

Нами был применен ряд вариантов, включающих культивирование сепарированных лимфоцитов (обогащенных НК-клетками) больных РМЖ, как с 1 из γ С-цитокинов, так и с комплексом из 2–3. Несмотря на активную индукцию пролиферации, вызванную ИЛ-2 и ИЛ-15, через 10 сут непрерывного воздействия одним ИЛ-15 на сепарированные НК скорость и индекс пролиферации были выше, чем после культивирования с ИЛ-2. Таким образом, среди всех исследованных в нашей работе цитокинов и их комбинаций только ИЛ-15 вызывает наиболее пролонгированную активацию НК. Он представляется наиболее перспективным для этой цели, поскольку стимулирует широкий спектр иммунокомпетентных клеток: НК, антигенспецифические Т-лимфоциты, включая долгоживущие Т-клетки памяти; важным свойством является и его способность вызывать их миграцию из крови в ткани. Для нас особенно важно, что он обеспечивает выживаемость НК-клеток при длительном культивировании, а в литературе описана и его способность обеспечивать выживание НКТ-клеток *in vivo* через механизм аутофагии [28].

ИЛ-7 в наших опытах проявлял минимальное, и не во всех тестах, и не во все сроки исследования, стимулирующее действие на пролиферацию выделенных клеток, хотя при наличии среди них значительной доли НКТ-клеток, в частности инвариантных, оптимальными могут оказаться сочетания цитокинов, включающие ИЛ-7, так как именно он является стимулятором их пролиферации [29].

С учетом обычно непродолжительной выживаемости стимулированных лимфоцитов *in vivo* исследования развиваются в направлении ее повышения, например путем создания рекомбинантной фьюжен-структуры, в состав которой входят ИЛ-7 и ИЛ-15, из чего следует эффективность такой комбинации. Лимфоциты, полученные после стимуляции конструкцией из обоих цитокинов, дольше сохраняли жизнеспособность, активность, интенсивно инфильтрировали опухоль [30].

Таким образом, нами получена максимальная стимуляция пролиферации НК, сепарированных из крови больных РМЖ, при стимуляции *in vitro* ИЛ-15 и комбинациями γ С-цитокинов, включающих его.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Мушкарина Т.Ю., Кузьмина Е.Г. Многомерный анализ иммунитета с выделением роли Т-регуляторных клеток при лучевых повреждениях легких. Медицинский академический журнал 2016;16(4):161–2. [Mushkarina T.Ju., Kuz'mina E.G. Multivariate analysis of immunity highlighting the role of regulatory T cells in radiation damage to the lungs. Medicinskij akademicheskij zhurnal = Medical academic journal 2016;16(4):161–2. (In Russ.)].
- Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. Киев: Наукова думка, 2005. 792 с. [Berezhnaya N.M., Chekhun V.F. Immunology of malignant growth. Kiev: Naukova dumka, 2005. 792 p. (In Russ.)].
- Киселевский М.В., Чикилева И.О., Жаркова О.В. и др. Перспективы комбинированной терапии онкологических больных интерлейкином-2 и ингибиторами контрольных иммунных точек. Вопросы онкологии 2020;66(1):23–8. [Kiselevskij M.V., Chikileva I.O., Zharkova O.V. et al. Prospects of combining interleukin-2 with immune checkpoint inhibitors for cancer therapy. Voprosy onkologii = Oncology issues 2020;66(1):23–8 (In Russ.)].
- Златник Е.Ю., Ситковская А.О., Непомнящая Е.М. и др. Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. Казанский медицинский журнал 2018;99(5):792–801. [Zlatnik E.Ju., Sitkovskaja A.O., Nepomnjashhaja E.M. et al. Achievements and prospects of cellular technologies based on the activated lymphocytes in the treatment of malignant tumors. Kazanskij medicinskij zhurnal = Kazan medical journal 2018;99(5):792–801 (In Russ.)]. DOI: 10.17816/KMJ2018-792.
- Шамова Т.В., Ситковская А.О., Ващенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э. Адоптивная клеточная терапия: достижения последних лет. Южно-Российский онкологический журнал 2020;1(1):43–59. [Shamova T.V., Sitkovskaja A.O., Vashhenko L.N., Kechedzhieva Je.Je. Adoptive cell therapy: current advances. Juzhno-Rossijskij onkologicheskij zhurnal = South-Russian journal of cancer 2020;1(1):43–59 (In Russ.)].
- Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M. et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2-2 to patients with metastatic cancer. N Engl J Med 1985;313(23):1485–92. DOI: 10.1056/NEJM198512053132327.
- Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M. et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2-2 or high-dose interleukin-2-2 alone. N Engl J Med 1987;316(15):889–97. DOI: 10.1056/NEJM198704093161501.
- Kimura H., Yamaguchi Y. A phase III randomized study of interleukin-2 lymphokine-activated killer cell immunotherapy combined with chemotherapy or radiotherapy after curative or noncurative resection of primary lung carcinoma. Cancer 1997;80(1):42–9.
- Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Шамова Т.В. и др. Генерация лимфокин-активированных киллеров на фоне сниженного содержания Т-регуляторных клеток *in vitro*. Цитология 2020;62(10):7–13 [Sitkovskaja A.O., Zlatnik E.Ju., Shamova T.V. et al. The effect of T-regulatory cells separation from blood mononuclear cells on the generation of lymphokine-activated killers. Citologija = Cytology 2020;62(10):7–13 (In Russ.)].
- André F., Zielinski C.C. Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. Ann Oncol 2012;23:vi46–51. DOI: 10.1093/annonc/mds195.
- Juliá E.P., Amante A., Pampena M.B. et al. Avelumab, an IgG1 anti-PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor, Triggers NK Cell-Mediated Cytotoxicity and Cytokine Production Against Triple Negative Breast Cancer Cells. Front Immunol 2018;9:2140. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02140.
- DeGottardi M.Q., Okoye A.A., Vaidya M. et al. Effect of Anti-IL-15 Administration on T Cell and NK Cell Homeostasis in Rhesus Macaques. J Immunol 2016;197(4):1183–98. DOI: 10.4049/jimmunol.1600065.
- Wagner J., Pfannenstiel V., Waldmann A. et al. A Two-Phase Expansion Protocol Combining Interleukin (IL)-15 and IL-21 Improves Natural Killer Cell Proliferation and Cytotoxicity against Rhabdomyosarcoma. Front Immunol 2017;8:676. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00676.
- Godfrey D.I., Stankovic S., Baxter A.G. Raising the NKT cell family. Nature Immunol 2010;11(3):197–206. DOI: 10.1038/ni.1841.
- Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н. и др. Увеличение количества NKT-клеток – маркер раннего прогрессирования при адьювантной вакцинотерапии пациентов с метастатической меланомой кожи. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(4):82–9. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zabolina T.N. et al. Increase in NKT cells – a marker of early progressing at adjuvant vaccinotherapy of patients with a metastatic melanoma of skin. Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(4):82–9 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-82-89.
- Godfrey D.I., Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. J Clin Invest 2004;114(10):1379–88. DOI: 10.1038/nri11309.
- Viale R., Ware R., Maricic I. et al. NKT cell subsets can exert opposing effects in autoimmunity, tumor surveillance and inflammation. Curr Immunol Rev 2012;8(4):287–96. DOI: 10.2174/157339512804806224.
- East J.E., Kennedy A.J., Webb T.J. Raising the roof: The preferential pharmacological stimulation of Th1 and Th2 response mediated by NKT cells. Med Res Rev 2014;34:45–76. DOI: 10.1002/med.21276.
- Черткова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К. и др. Основные параметры клеточного иммунитета у больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом. Медицинская иммунология 2018;20(5):667–80. [Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua Je.K. et al. The main parameters of cellular immunity in patients with triple-negative breast cancer: relationship with efficiency of chemotherapy. Medicinskaja immunologija = Medical immunology 2018;20(5):667–80 (In Russ.)]. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5.
- Nair S., Dhodapkar M.V. Natural killer T cells in cancer immunotherapy. Front Immunol 2017;8:1178. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01178.
- Bedolla D.E., Kenig S., Mitri E. et al. Further insights into the assessment of cell cycle phases by FTIR microspectroscopy. Vibrational Spectroscopy 2014;75:127–35.
- Elledge S.J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science 1996;274:1664–72. DOI: 10.1126/science.274.5293.1664.
- Akaike Y., Chibazakura T. Aberrant activation of cyclin a-CDK induces G2/m-phase checkpoint in human cells. Cell Cycle 2020;19:84–96. DOI: 10.1080/15384101.2019.1693119.
- Yang M., Li L., Chen S. et al. Melatonin protects against apoptosis of megakaryocytic cells via its receptors

- and the AKT/mitochondrial/caspase pathway. *Aging* (Albany NY) 2020;12(13):13633–46. DOI: 10.18632/aging.103483.
25. Дейнеко Н.Л., Дергунова Н.Н., Булычева Т.И. и др. Митогенное и токсическое действие фитогемагглютина на лимфоциты периферической крови человека в культуре. *Иммунология* 2003;4:205–8. [Dejneko N.L., Dergunova N.N., Bulycheva T.I. et al. The mitogenic and toxic effects produced by phytohemagglutinin on the peripheral-blood lymphocytes of man in culture. *Immunologiya = Immunology* 2003;4:205–8 (In Russ.)].
 26. Варфоломеева М.И., Латышева Т.В., Сетдикова Н.Х. и др. Характеристика лимфоцитов периферической крови у больных с общей варибельной иммунологической недостаточностью и возможный путь коррекции нестойкости лимфоидных элементов. *Иммунология* 2002;6:340–3. [Varfolomeeva M.I., Latysheva T.V., Setdikova N.H. et al. Characteristics of peripheral blood lymphocytes in patients with general variable immunological insufficiency and a possible way of correcting the insolventy of lymphoid elements. *Immunologiya = Immunology* 2002;6:340–3 (In Russ.)].
 27. Romee R., Leong J.W., Fehniger T.A. Utilizing Cytokines to Function-Enable Human NK Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Scientifica* (Cairo) 2014;2014:205796. DOI: 10.1155/2014/205796.
 28. Zhu L., Xie X., Zhang L. et al. TBK-binding protein 1 regulates IL-15-induced autophagy and NKT cell survival. *Nat Commun* 2018;9(1):2812. DOI: 10.1038/s41467-018-05097-5.
 29. Park J.Y., Keller H., Sato N., Park J.H. NKT cells require IL-7, not IL-15, for survival and homeostasis. *J Immunol* 2014;192(1 Supplement):65.18.
 30. Song Y., Liu Y., Hu R. et al. *In vivo* antitumor Activity of a Recombinant IL-7/IL-15 Hybrid Cytokine in Mice. *Mol Cancer Ther* 2016;15(10):2413–21. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0111.

Вклад авторов

А.О. Ситковская: анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 Е.Ю. Златник: концепция и дизайн исследования;
 С.Ю. Филиппова: экспериментальная работа, техническое редактирование, оформление библиографии, подготовка иллюстраций;
 Е.С. Бондаренко: экспериментальная работа;
 Л.Н. Вашенко, Э.Э. Кечеджиева, И.Р. Дашкова, Е.А. Андрейко: получение образцов крови пациентов;
 И.А. Новикова: научное редактирование.

Authors contributions

A.O. Sitkovskaya: data analysis and interpretation, article text writing;
 E.Yu. Zlatnik: research concept and design;
 S.Yu. Filippova: experimental work, technical editing, preparation of bibliography and illustrations;
 E.S. Bondarenko: experimental work;
 L.N. Vaschenko, E.E. Kechedzhieva, I.R. Dashkova, E.A. Andreiko: obtaining blood samples from patients;
 I.A. Novikova: scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.О. Ситковская / A.O. Sitkovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>
 Е.Ю. Златник / E.Yu. Zlatnik: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>
 С.Ю. Филиппова / S.Yu. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>
 Л.Н. Вашенко / L.N. Vashenko: <https://orcid.org/0000-0002-7302-7031>
 И.А. Новикова / I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118072790017-9 «Разработка и применение новых методов клеточных технологий для иммунотерапии опухолей».

Financing. The work was carried out within the framework of the state assignment No АААА-А18-118072790017-9 “Development and application of new methods of cellular technologies for tumor immunotherapy”.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 05.08.2020. Принята к публикации: 16.10.2020.

Article submitted: 05.08.2020. Accepted for publication: 16.10.2020.