

# Оценка воздействия различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность клеток – натуральных киллеров

П.О. Фёдорова<sup>1–3</sup>, И.О. Чикилева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Полина Олеговна Фёдорова [ppolite@mail.ru](mailto:ppolite@mail.ru)

**Введение.** Одним из подходов для обогащения популяций натуральных киллеров (НК) и натуральных киллеров Т-клеток (НКТ-клеток) для последующей CAR-терапии (CAR – химерный рецептор антигена) является культивирование в присутствии определенных цитокинов и/или фидерных клеток.

**Цель исследования** – оценка воздействия на НК- и НКТ-клетки комбинаций интерлейкинов (ИЛ): ИЛ-2 + ИЛ-15, ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 или только ИЛ-2 при длительном культивировании в присутствии аутологичных фидерных клеток, в качестве которых выступали необлученные Т-лимфоциты, активированные моноклональными антигенами (МАТ).

**Материалы и методы.** В качестве источника мононуклеарных клеток человека использовали периферическую кровь и лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат. После выделения мононуклеарных клеток проводили активацию полученной культуры лимфоцитов с помощью сорбированных МАТ к CD3- и CD28-рецепторам. Затем осуществляли культивирование активированных лимфоцитов в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15, ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 или только ИЛ-2, периодически оценивая прирост общего количества клеток, экспрессию поверхностных маркеров и цитотоксическую активность.

**Результаты.** При использовании комбинации ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 наблюдали наибольший прирост клеток и максимальную цитотоксичность, доля НКТ-клеток (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) к концу срока культивирования также была наибольшей относительно других режимов культивирования и составила 59 %. В присутствии комбинации ИЛ-2 и ИЛ-15 определяли более низкую цитотоксичность культивируемых лимфоцитов по сравнению с другими вариантами эксперимента, что может быть связано с истощением клеточной популяции. Согласно данным литературы, добавление в культуральную среду ИЛ-21, вероятно, нивелирует данное отрицательное воздействие ИЛ-15.

**Заключение.** С учетом динамики пролиферации, рецепторного профиля и цитотоксичности культивируемых лимфоцитов можно заключить, что комбинация цитокинов, состоящая из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, является наиболее эффективной для обогащения популяции НКТ-клеток при стимуляции МАТ и в присутствии аутологичных активированных Т-лимфоцитов. Для максимально эффективного получения популяции НК-клеток требуется использование других фидерных клеток, вероятно, опухолевого происхождения, либо иных протоколов экспансии.

**Ключевые слова:** CAR-НК-клетки, CAR-НКТ-клетки, CAR-терапия, интерлейкин 21, интерлейкин 15

**Для цитирования:** Фёдорова П.О., Чикилева И.О. Оценка воздействия различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность клеток – натуральных киллеров. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):22–31.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-22-31>

## Evaluation of the effects of different interleukin combinations on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells

Polina O. Fedorova<sup>1-3</sup>, Irina O. Chikileva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Maly Kazenny Lane, Moscow 105064, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia

**Contacts:** Polina Olegovna Fedorova [ppolite@mail.ru](mailto:ppolite@mail.ru)

**Background.** One of the approaches to expand natural killer (NK) and NKT cells for subsequent CAR (chimeric antigen receptor) therapy is cultivation in the presence of certain cytokines and/or feeder cells.

**Aim.** To evaluate the effect of combinations of interleukin (IL): IL-2 + IL-15, IL-2 + IL-15 + IL-21 or IL-2 alone on NK and NKT cells during long-term cultivation in the presence of autologous feeder cells, which were non-irradiated T lymphocytes activated by monoclonal antibodies (mAbs).

**Materials and methods.** Peripheral blood and leukocyte-platelet concentrate were used as a source of peripheral blood mononuclear cell. After peripheral blood mononuclear cell isolation, the lymphocyte culture was activated using adsorbed mAbs to CD3 and CD28 receptors. Then, activated lymphocytes were cultured in the presence of IL-2 + IL-15, IL-2 + IL-15 + IL-21, or IL-2 alone, periodically assessing the increase in the total number of cells, expression of surface markers, and cytotoxic activity.

**Results.** Using the combination of IL-2 + IL-15 + IL-21, the greatest increase in cells and maximum cytotoxicity were observed; the proportion of NKT cells (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) by the end of the cultivation was also the highest compared to other cultivation modes and amounted to 59 %. In the presence of a combination of IL-2 and IL-15, lower cytotoxicity of the cultured lymphocytes was determined compared to other experimental options, which may be due to exhaustion of the cell population. Based on the literature data, the addition of IL-21 to the culture medium probably neutralizes this negative effect of IL-15.

**Conclusion.** Based on the dynamics of proliferation, receptor expression and cytotoxicity of cultured lymphocytes, it can be concluded that the cytokine combination consisting of IL-2, IL-15 and IL-21 is most effective for enriching the NKT cell population upon stimulation with mAb and in the presence of autologous activated T lymphocytes. For the most effective generation of the NK cell population, it is necessary to use other feeder cells, probably of tumor origin, or other expansion protocols.

**Keywords:** CAR NK cells, CAR NKT cells, CAR therapy, interleukin-21, interleukin-15

**For citation:** Fedorova P.O., Chikileva I.O. Evaluation of the effects of different interleukin combinations on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(2):22–31. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-22-31>

### Введение

Адоптивная иммунотерапия, применяемая для лечения онкологических заболеваний, вызвала значительный прогресс в эффективности лечения рака, особенно В-клеточных лимфом, при иммунотерапии которых ремиссия наступает у 25–50 % пациентов. Так, терапия на основе химерного рецептора антигена (CAR) направлена на повышение способности иммунных клеток распознавать опухолеассоциированные антигены и уничтожать опухолевые клетки [1]. CAR-лимфоциты экспрессируют на своей поверхности химерный рецептор к опухолеассоциированным антигенам, причем генетическая последовательность, кодирующая данный рецептор, вводится лимфоцитам посредством различных методов генетической модификации в условиях *in vitro* [2].

В настоящее время клеточная терапия на основе CAR-T-лимфоцитов с успехом применяется для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза, остро-

го лимфобластного В-клеточного лейкоза и диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы [3]. Терапия на основе Т-лимфоцитов, экспрессирующих CAR, показала высокие клинические результаты при гематологических злокачественных новообразованиях, применение CAR-T-лимфоцитов для лечения солидных опухолей различного генеза находится на стадии клинических испытаний [4]. Тем не менее данный подход к иммунотерапии рака имеет ряд недостатков и ограничений. Проявление токсической реакции в тканях, не пораженных опухолью (главным образом нейротоксичность), и развитие синдрома высвобождения цитокинов представляют собой основные побочные явления, ограничивающие терапевтический индекс и, как следствие, его терапевтическое применение [5]. К нежелательным реакциям также относится миграция CAR-T-клеток за пределы опухоли, синдром распада злокачественной опухоли и цитопения [6]. Другим недостатком применения

CAR-T-терапии является необходимость тщательной оценки степени совместимости донора и реципиента по системе главных лейкоцитарных антигенов человека (HLA-антигенам). Выбор аутологичного источника Т-клеток бывает затруднительным ввиду иммуносупрессивного воздействия химио-, лучевой терапии или подавления иммунитета опухолью. Вследствие этого процесс создания индивидуально-биомедицинского клеточного продукта (и-БМКП) на основе CAR-T-лимфоцитов длительный и трудоемкий ввиду подбора подходящего донора клеток (персонализированный), что влияет на стоимость лечения и сроки начала введения пациенту и-БМКП.

В качестве способа преодоления существующих проблем CAR-T-терапии предлагается использование в качестве клеток-эффекторов других клеток иммунной системы, обладающих цитотоксическими свойствами, – натуральных киллеров (НК) и натуральных киллеров Т-клеток (НКТ-клеток). CAR-терапия на основе НК-клеток не требует подбора донора по системе HLA [7], поэтому БМКП в данном случае могут изготавливаться заранее, в больших количествах, а затем проходить этап криоконсервации. Таким образом, пациент может незамедлительно начать проходить курс иммунотерапии, кроме того, стоимость клеточного продукта за счет массового производства препарата будет снижена. Существенными достоинствами НК-клеток при их использовании в иммунотерапии являются распознавание нормальных клеток с помощью группы KIR-рецепторов (killer-cell immunoglobulin-like receptors) клеток и осуществление эффекторной функции 2 различными механизмами: путем секреторного и несекреторного лизиса [8]. Кроме того, при введении пациентам популяции НК не наблюдается выраженных побочных эффектов [9]. Тем не менее относительно Т-лимфоцитов НК-клетки хуже поддаются генетическим модификациям, имеют короткий жизненный цикл и ограниченную экспансию зрелой популяции [10]. Следовательно, *in vitro* экспансия НК-клеток и поддержание их цитотоксической функции являются важным этапом при разработке CAR-НК-клеток.

Использованию НКТ-клеток для CAR-терапии способствуют следующие свойства данной популяции: мощная противоопухолевая активность посредством прямой цитотоксичности или активации  $\alpha\beta$ T-клеток, снижение ингибирующей активности опухолеассоциированных макрофагов и миелоидных супрессорных клеток, а также отсутствие риска развития реакции «трансплантат против хозяина» ввиду активации через ингибирующие рецепторы НК [11]. Несмотря на многообещающие результаты исследований CAR-НКТ-клеток в доклинических и клинических исследованиях, существует несколько трудностей при разработке технологии подобного рода. Например, незначительное количество НКТ-клеток

в периферической крови человека требует использования методик для экспансии НКТ-клеток *in vitro*.

Согласно данным литературы, существует 3 подхода к обогащению популяций НК- и НКТ-клеток: использование специфических веществ – активаторов пролиферации, культивирование в присутствии определенных цитокинов или соинкубация с фидерными клетками [12]. Исторически первым цитокином, который начали применять для повышения цитотоксичности НК-клеток как *in vivo*, так и *ex vivo*, был интерлейкин (ИЛ) 2. При использовании ИЛ-2 в низких дозах наблюдаются экспансия НК-клеток и увеличение их противоопухолевой активности [13]. ИЛ-2 вызывает повышенную секрецию цитокинов НК, усиливает внутриклеточную передачу сигналов STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)/АКТ (protein kinase B) и активирует группу различных рецепторов естественной токсичности и NKG2D-рецептор (natural killer group 2, member D) [13]. ИЛ-2-активированные НК-клетки проявляют гораздо более высокую цитотоксическую активность в отношении культуры-мишени K562 и более высокую жизнеспособность после криоконсервации по сравнению с нестимулированными НК-клетками [14]. Другим цитокином, который играет важную роль в активации НК-клеток, является ИЛ-15. Он способствует выживаемости НК, увеличивает продолжительность жизни и противоопухолевую активность НКТ-клеток [15]. Для экспансии НК-клеток также используют ИЛ-21, который участвует в дифференцировке НК-клеток из гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток и усиливает цитотоксичность и секрецию цитокинов [16]. Помимо того, для экспансии НК-клеток применяют ИЛ-12 и ИЛ-18, которые повышают эффекторные функции и участвуют в формировании цитокин-индуцированной субпопуляции НК-клеток памяти [17].

В качестве фидерных клеток используют аутологичные или аллогенные источники клеток, которые до соинкубации с НК-клетками проходят процесс иррадиации или обработки митостатиками для блокировки их клеточного деления. В качестве аллогенных фидерных клеток рассматриваются опухолевые линии, являющиеся естественной мишенью для НК-клеток или экспрессирующие трансгенные мембраносвязанные лиганды для распознавания НК-клетками [18]. Аутологичные фидерные клетки – популяции иммунных клеток, выделяемые одновременно из того же источника, что и НК. Так, данные клетки выделяют спектр необходимых цитокинов, а также способствуют активации НК- и НКТ-клеток посредством прямого межклеточного взаимодействия [33].

В данном исследовании проводили культивирование НК- и НКТ-клеток в присутствии необлученных аутологичных фидерных клеток, в качестве которых

выступали Т-клетки, активированные моноклональными антителами (МАТ) к CD3- и CD28-рецепторам.

**Цель исследования** — оценка воздействия на НК- и НКТ-клетки комбинаций: ИЛ-2 + ИЛ-15, ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 или только ИЛ-2 при длительном культивировании в присутствии аутологичных фидерных клеток, в качестве которых выступали необлученные Т-лимфоциты, активированные МАТ.

### Материалы и методы

#### Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата проводили с использованием метода седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколла ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ). Кровь из пробирок, содержащих этилендиаминтетрауксусную кислоту, разводили в 2 раза раствором Хенкса («ПанЭко», Россия). При выделении клеток из лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата его центрифугировали в течение 10 мин при 1500 г и температуре 23 °С, отбирали лейкоцитарный слой и разводили его средой (раствором Хенкса) в 3 раза. Затем независимо от источника МНК образцы наслаивали на 1,5 мл фиколла (Ficoll Paque, GE Healthcare, США) и центрифугировали в течение 25 мин при 1500 г и температуре 23 °С. Отбирали слой МНК и осуществляли 3-кратную отмывку раствором Хенкса, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 г, температуре 23 °С и каждый раз отбирая после этого надосадочную жидкость. Далее проводили подсчет живых клеток с использованием красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия), окрашивающего нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной, в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея). Показатель жизнеспособности >90 %, определяемый автоматически как отношение живых клеток к общему количеству клеток, выраженное в процентах, считали удовлетворительным. Клетки доводили до рабочей концентрации  $3,5\text{--}4 \times 10^6/\text{мл}$  с помощью питательной среды DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия) и 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия). После этого свежeweделенные МНК подвергали активации.

#### Сорбция моноклональных антител для последующей активации мононуклеарных клеток

Для активации МНК использовали МАТ к CD3- и CD28-рецепторам (BioLegend, США) в концентрации 2,5 мкг/мл анти-CD3-антител и 5 мкг/мл анти-CD28-антител. Для достижения заданной концентрации

антител готовили их растворы в стерильном фосфатном буферном солевом растворе (ФСБ) и добавляли по 1 мл/лунку в стерильный 12-луночный культуральный планшет (SPL life Sciences, Республика Корея). Затем проводили инкубацию в течение 5 ч с последующей трехкратной отмывкой от несвязавшихся антител с помощью 1 % раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Roedermark, Germany) в ФСБ.

#### Активация свежeweделенных мононуклеарных клеток

При активации МАТ суспензию свежeweделенных МНК вносили к сорбированным антителам в концентрации  $3,5\text{--}4 \times 10^6/\text{мл}$  и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе модели SCO5A (Sheldon Manufacturing Inc, США).

#### Культивирование лимфоцитов

Культивирование лимфоцитов проводили в течение 21 дня с момента выделения МНК. Клетки культивировали в 12- и 6-луночных культуральных планшетах (SPL life Sciences, Республика Корея) в присутствии питательной среды DMEM с 4,5 г/л глюкозы, 10 % FBS, 250–500 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-2 (Xuri, Китай), 10 нг/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-15 (Sci-Store, Россия), 20 нг/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-21 (Peprotech, США) при температуре 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Каждые 1–2 дня с помощью световой микроскопии производили контроль фенотипических характеристик лимфоцитов и визуальный контроль отсутствия микробной контаминации. С использованием трипанового синего и автоматического счетчика клеток проводили оценку жизнеспособности и количества культивируемых клеток на 3, 7, 11, 14, 18 и 21-е сутки культивирования. Показатель жизнеспособности >90 % считали удовлетворительным. Концентрацию клеток при культивировании поддерживали в диапазоне от  $3 \times 10^5/\text{мл}$  до  $1 \times 10^6/\text{мл}$ .

#### Определение количества лимфоцитов

Подсчет живых культивируемых клеток проводили с использованием красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия) в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея). Для дальнейшего расчета допускались только живые клетки. Общее количество клеток определяли по следующей формуле:

$$\begin{aligned} & \text{Общее количество клеток к } n\text{-дню, млн/мл} = \\ & \text{количество клеток в } m\text{-день при подсчете, млн/мл} \times \\ & \frac{\text{количество клеток}}{\text{количество клеток в } m\text{-день при посеве, млн/мл}}, \end{aligned} \quad (1)$$

где  $n$  — день культивирования, в который проводят определение общего количества клеток;  $m$  — предыдущий день подсчета и посева клеток относительно  $n$ -дня.

#### Культивирование культур клеток

В работе использовали опухолевую линию клеток HG3, полученную из коллекции клеточных культур НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. При работе с культурой HG3 использовали питательную среду RPMI 1640, содержащую 4,5 г/л глюкозы, 10 % FBS и пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия). Клеточную линию инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С.

#### Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитофлуориметрии производили анализ экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов. На этапе пробоподготовки жизнеспособные клетки подсчитывали и доводили до концентрации  $1 \times 10^6$ /мл. К 100 мкл суспензии клеток заданной концентрации добавляли меченные флюорохромом МАТ в концентрациях, рекомендованных производителем. Инкубировали в течение 30 мин при температуре 4 °С в холодильнике (Hitachi, Япония). Затем проводили 3-кратную отмывку раствором ФСБ от несвязавшихся антител, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 g и температуре 23 °С и удаляя надосадочную жидкость. К осадку прибавляли 200 мкл ФСБ и раствор пропидия йодида (PI) до конечной концентрации 30 нг/мл (Sigma, США). Изучение экспрессии поверхностных маркеров осуществляли при использовании следующих МАТ: анти-CD3-PerCP (BD Pharmingen, США), анти-CD3-FITC (Beckman Coulter, США), анти-CD56-PE (Life Technologies, США), анти-CD (56<sup>+</sup>16) – PE (Beckman Coulter, США), анти-CD8-APC (Invitrogen, США), анти-CD4-FITC (BD Pharmingen, США), анти-CD16-FITC (BD Pharmingen, США), анти-NKp30/CD337-PE (BD Pharmingen, США), анти-NKG2D/CD314-APC (BD Pharmingen, США). Комбинацию меченных флюорохромами антител для обработки проб подбирали с учетом особенности диапазона детекции длины волны каждого флюорохрома. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences Inc, США) с использованием специализированного программного обеспечения NovoExpress 1.5.0. Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию PI и по показателям рассеивания. Анализировали не менее 10 тыс. живых клеток.

#### Цитотоксический тест

Для оценки эффекторной функции культивируемых лимфоцитов использовали раствор резазурина в концентрации 5 мг/мл (Sigma-Aldrich, США).

В качестве культуры-мишени использовали клеточную линию HG3. Для проведения цитотоксического теста использовали стерильные 96-луночные планшеты (SPL life Sciences, Республика Корея), в которые одновременно вносили клетки-эффекторы (Э) и клетки-мишени (М) в различных соотношениях Э:М: 10:1, 5:1, 2,5:1, 1:1. При проведении цитотоксического теста концентрация клеток-мишеней составляла  $0,5 \times 10^4$  кл/лунку. В качестве отрицательного контроля использовали лунки, в которые вместо Э вносили полную ростовую среду DMEM. В качестве отрицательного контроля Э использовали лунки, в которые вместо мишеней вносили полную ростовую среду DMEM. Конечный объем в каждой контрольной или экспериментальной лунке составлял 220 мкл. Каждую точку анализировали в 3 повторах. Затем планшет инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 1 сут. На следующий день в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора резазурина в соответствии с протоколом AlamarBlue Cell Viability Reagent Product Information Sheet (Pub. No. MAN0018317 C. 0). Затем планшет инкубировали в течение суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С и измеряли интенсивность флуоресценции на мультирежимном планшетном ридере Spark (Tecan, Швейцария). Анализ проводили при длине возбуждения 560 нм и длине эмиссии 600 нм с использованием программного обеспечения Sparkcontrol v3.1. Цитотоксичность (%) рассчитывали по следующей формуле:

$$(1 - ((Э + М) - Э)/М) \times 100, \quad (2)$$

где  $Э + М$  — среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились Э и М;  $Э$  — среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились только Э;  $М$  — среднее значение интенсивности флуоресценции для 3 аналогичных лунок, в которых находились только М.

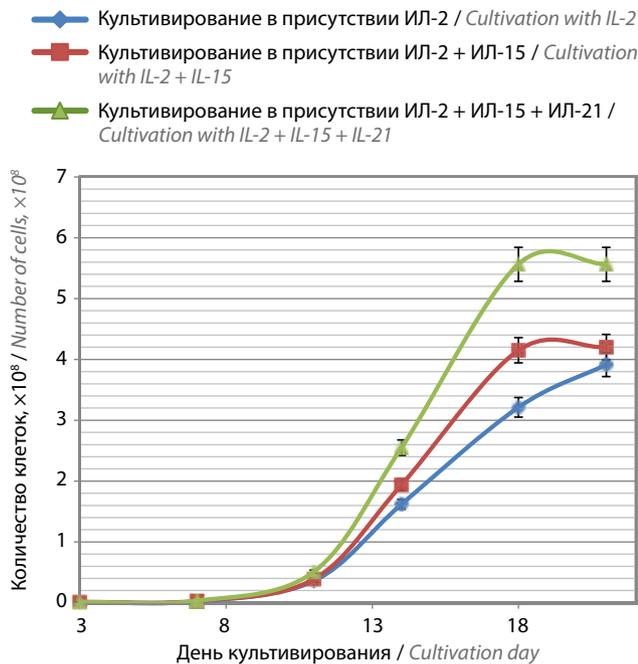
#### Статистическая обработка данных

Данные экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  SD. Результаты проанализированы с использованием программы Statistica 10. Тест ANOVA (analysis of variance) с критерием Tukey HSD использовался для оценки различий. Статистически значимыми считали значения  $p < 0,05$ .

#### Результаты

##### Определение количества культивируемых лимфоцитов

Результаты определения количества лимфоцитов, культивируемых в присутствии ИЛ-2, ИЛ-2 + ИЛ-15 или ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21, представлены на рис. 1.



**Рис. 1.** Динамика пролиферативной активности лимфоцитов в разные дни культивирования;  $p < 0,05$

**Fig. 1.** Dynamics of lymphocyte proliferation on different cultivation days;  $p < 0.05$

Исходя из полученных данных, в интервале с 11-го по 21-й день подсчета наибольший прирост лимфоцитов наблюдается при культивировании в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21.

#### Оценка популяционного состава культивируемых лимфоцитов и экспрессии поверхностных маркеров

Количество клеток (%), экспрессирующих различные поверхностные маркеры, представлено в табл. 1 и на рис. 2. Так, установлено, что независимо от влияния изучаемых интерлейкинов, присутствующих в питательной среде, на 7-й день культивирования наблюдается увеличение доли Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD56^-$ ) до 95–96 %, которая затем к концу культивирования постепенно снижается до 40–57 % в зависимости от режима культивирования. Снижается также и доля  $CD3^+CD4^+$ -клеток, составляющая 45–54 % всех лимфоцитов на 7-й день и 21–24 % на 21-й день. Количество  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов, наоборот, увеличивается к концу срока культивирования (67–70 %) относительно первоначального значения для данной популяции (25 %). Особо важно подчеркнуть, что при длительном культивировании в течение 21 дня доля  $CD56^+$ -лимфоцитов, составляющая 14,5 % в начале культивирования и 42–60 % на 21-й день исследования, возрастает главным образом за счет популяции НКТ-клеток ( $CD3^+CD56^+$ ), доля которых к концу срока культивирования составляет 42–59 %. Происходит также плавное увеличение

доли клеток, экспрессирующих активационный поверхностный маркер NKG2D, до 34–50 % культивируемых лимфоцитов к концу срока культивирования.

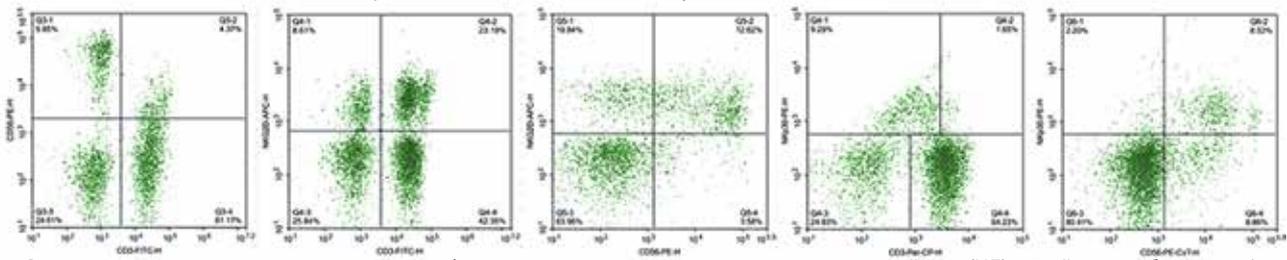
Как видно из данных, представленных в табл. 1, при культивировании лимфоцитов в присутствии комбинации ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 к 21-му дню наблюдения происходит наибольшее увеличение в процентах доли  $CD56^+$ -клеток: 59,68 % в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 против 42,46 и 44,57 % в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-2 + ИЛ-15 соответственно. Также на 21-й день проведения эксперимента в этой группе существенно возрастает доля  $CD56^+NKG2D^+$ -клеток до максимального 50 %-значения среди анализируемых экспериментальных групп и наблюдается незначительное увеличение относительно других режимов культивирования доли НК-клеток ( $CD56^+CD3^-$ ) – 1,12 %. Примечательно, что при культивировании в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 наблюдается пониженный уровень экспрессии маркера  $NKp30^+$  на  $CD3^+$ - и  $CD56^+$ -лимфоцитах относительно других режимов культивирования на протяжении всех дней ведения первичной культуры. Доля лимфоцитов, экспрессирующих  $NKp30$ -рецептор, составляет 2,31 % при культивировании в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21, 6,54 % – при использовании только ИЛ-2 и 6,12 % – при добавлении в питательную среду ИЛ-2 + ИЛ-15. Экспрессия  $NKp30$ -маркера прямо коррелирует с количеством НК-клеток в культуре лимфоцитов: при снижении доли натуральных киллеров происходит уменьшение доли  $NKp30^+$ -клеток. На поздних сроках культивирования все лимфоциты, экспрессирующие данный маркер, являются  $CD3^+$ -популяцией. Экспрессия  $CD16$ -рецептора при длительном культивировании снижается от 7,19 % на момент выделения МНК до нулевых значений вне зависимости от используемых интерлейкинов.

#### Изучение эффекторных функций культивируемых лимфоцитов

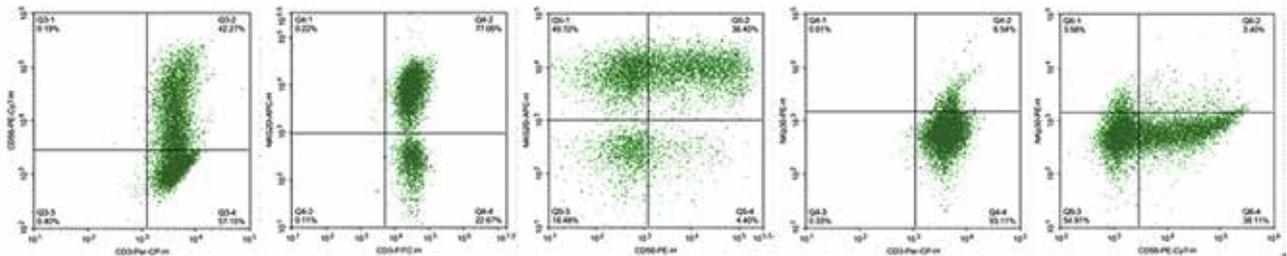
Самые статистически достоверные данные о цитотоксичности культивируемых лимфоцитов в отношении опухолевой линии HG3 выявлены при соотношении Э:М 5:1. Поэтому анализ эффекторных функций проводили только при данном соотношении (табл. 2). В целом при длительном культивировании наблюдается динамика увеличения цитотоксической активности популяции лимфоцитов относительно начала ведения первичной культуры.

Исходя из данных цитотоксического теста, самый высокий процент лизиса опухолевых клеток наблюдается в группе лимфоцитов, при культивировании которых в питательную среду добавляли ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21, цитотоксичность в данном случае составляет от 59,3 до 78,9 % в зависимости от дня проведения

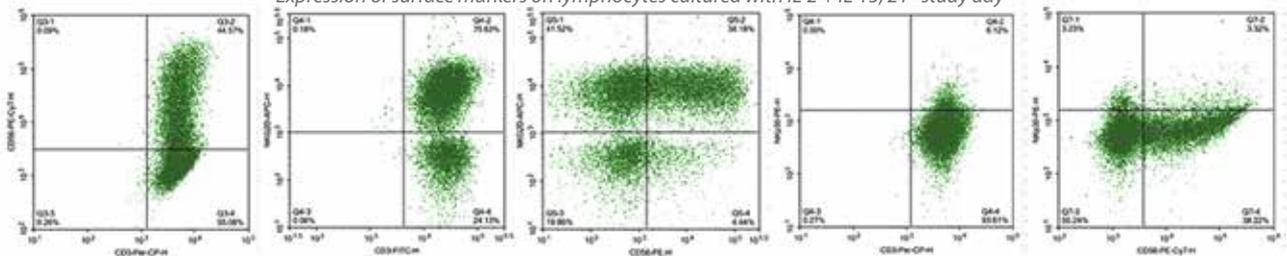
Экспрессия поверхностных маркеров на свежее выделенных мононуклеарных клетках /  
Expression of surface markers on freshly isolated mononuclear cells



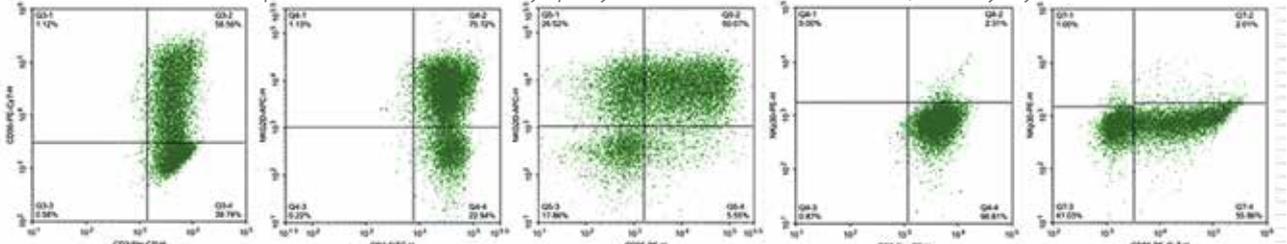
Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии интерлейкина (ИЛ) 2, 21-й день наблюдения /  
Expression of surface markers on lymphocytes cultured with interleukin (IL) 2, 21<sup>st</sup> study day



Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15, 21-й день наблюдения /  
Expression of surface markers on lymphocytes cultured with IL-2 + IL-15, 21<sup>st</sup> study day



Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21, 21-й день наблюдения /  
Expression of surface markers on lymphocytes cultured with IL-2 + IL-15 + IL-21, 21<sup>st</sup> study day



**Рис. 2.** Экспрессия поверхностных маркеров на культивируемых лимфоцитах. Результаты представлены по единичному донору и отражают средние значения для проведенной серии экспериментов;  $p < 0,05$

**Fig. 2.** Expression of surface markers on cultured lymphocytes. Results are presented for a single donor and reflect average values for the series of experiments performed;  $p < 0.05$

цитотоксического теста. При использовании комбинации ИЛ-2 + ИЛ-15 начиная с 14-х суток культивирования наблюдается более низкая цитотоксичность лимфоцитов (55,3–60,1 %) относительно других режимов культивирования.

### Обсуждение

Выбранный режим активации пролиферации иммунных клеток интенсивно стимулирует деление Т-клеточного звена. Активированные Т-лимфоциты также вносят свой вклад в общую цитотоксичность первичной культуры лимфоцитов. Однако в данной

работе Т-клетки использовали не в качестве целевой популяции, а как источник провоспалительных цитокинов для роста НК- и НКТ-клеток.

Поскольку при культивировании в присутствии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 к 21-му дню культивирования наблюдается наибольший прирост  $CD3^+CD56^+$ -лимфоцитов, вероятно, данная популяция возрастает не только относительно, но и в абсолютном значении, чем объясняется наибольший прирост общего числа культивируемых лимфоцитов именно в данной группе сравнения (см. рис. 1). Повышенная экспрессия NKG2D-рецептора на  $CD56^+$ -клетках

**Таблица 1.** Оценка популяционного состава культивируемых лимфоцитов и экспрессии поверхностных маркеров;  $p < 0,05$   
**Table 1.** Evaluation of the population composition of cultured lymphocytes and expression of surface markers;  $p < 0,05$

Параметр Parameter	Свежевыделенные мононуклеарные клетки Fresh peripheral blood mononuclear cells	Культивирование в присутствии интерлейкина (ИЛ), день Cultivation in the presence of interleukin (IL), day											
		ИЛ-2 IL-2			ИЛ-2 + ИЛ-15 IL-2 + IL-15			ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 IL-2 + IL-15 + IL-21					
		7-й 7 <sup>th</sup>	14-й 14 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	7-й 7 <sup>th</sup>	14-й 14 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	7-й 7 <sup>th</sup>	14-й 14 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>	7-й 7 <sup>th</sup>	14-й 14 <sup>th</sup>	21-й 21 <sup>st</sup>
Доля CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> cells, %	61,17 ± 5,2	94,46 ± 5,5	76,83 ± 6,2	57,15 ± 6,1	94,96 ± 4,9	85,31 ± 7,9	55,08 ± 6,1	95,51 ± 4,4	77,15 ± 7,9	39,74 ± 4,4			
Доля CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> cells, %	41,55 ± 4,8	47,76 ± 3,8	30,0 ± 3,1	23,97 ± 2,2	53,71 ± 4,9	30,3 ± 3,2	23,96 ± 2,2	45,01 ± 4,6	26,87 ± 2,9	20,46 ± 2,5			
Доля CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cells, %	24,79 ± 7,1	48,0 ± 5,1	64,6 ± 5,2	69,67 ± 6,7	44,1 ± 3,7	66,14 ± 6,2	68,76 ± 5,9	48,09 ± 5,0	65,8 ± 6,6	67,11 ± 6,8			
Иммунорегуляторный индекс Immunoregulatory index	1,68 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,46 ± 0,2	0,34 ± 0,1	1,22 ± 0,8	0,46 ± 0,1	0,35 ± 0,1	0,94 ± 0,2	0,41 ± 0,1	0,3 ± 0,1			
Доля CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD56 <sup>+</sup> cells, %	14,51 ± 4,2	5,32 ± 0,8	22,27 ± 2,1	42,46 ± 4,1	4,97 ± 0,6	23,24 ± 2,1	44,57 ± 3,7	4,17 ± 0,3	21,49 ± 2,3	5968 ± 5,3			
Доля CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	9,85 ± 3,3	0,2 ± 0,1	0,18 ± 0,1	0,19 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,84 ± 0,1	0,09 ± 0,1	0,34 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,12 ± 0,2			
Доля CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	4,37 ± 1,9	5,32 ± 0,7	22,09 ± 3,3	42,27 ± 3,8	4,57 ± 0,4	22,4 ± 1,9	44,57 ± 3,5	3,83 ± 0,4	20,99 ± 2,3	58,56 ± 5,8			
Доля NKG2D <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> cells, %	31,58 ± 3,8	50,07 ± 4,6	67,28 ± 6,6	77,17 ± 7,2	49,38 ± 5,1	66,65 ± 5,8	75,81 ± 7,6	50,83 ± 5,1	69,45 ± 7,0	76,85 ± 7,8			
Доля CD56 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD56 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> cells, %	12,62 ± 1,1	2,83 ± 0,5	14,82 ± 2,0	36,4 ± 3,5	2,55 ± 0,3	15,15 ± 1,6	34,18 ± 3,0	1,91 ± 0,3	14,3 ± 1,1	50,07 ± 4,4			
Доля CD3 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> NKG2D <sup>+</sup> cells, %	23,19 ± 2,5	49,93 ± 3,6	66,36 ± 5,4	77,0 ± 7,4	48,32 ± 4,7	66,96 ± 6,5	75,63 ± 7,1	49,9 ± 5,2	69,34 ± 6,6	75,72 ± 7,4			
Доля NKp30 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of NKp30 <sup>+</sup> cells, %	10,18 ± 1,1	10,1 ± 1,2	10,18 ± 1,1	6,54 ± 0,8	11,0 ± 1,3	10,32 ± 1,1	6,12 ± 0,7	4,91 ± 0,5	4,86 ± 0,5	2,31 ± 0,3			
Доля CD56 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD56 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> cells, %	8,53 ± 0,9	1,69 ± 0,4	3,76 ± 0,5	3,4 ± 0,5	1,7 ± 0,2	4,3 ± 0,5	3,32 ± 0,4	0,8 ± 0,1	2,39 ± 0,3	2,01 ± 0,2			
Доля CD3 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD3 <sup>+</sup> NKp30 <sup>+</sup> cells, %	1,65 ± 0,3	10,1 ± 0,9	10,18 ± 1,3	6,54 ± 0,9	11,0 ± 1,4	10,34 ± 1,3	6,12 ± 0,7	4,91 ± 0,5	4,86 ± 0,5	2,31 ± 0,3			
Доля CD16 <sup>+</sup> -клеток, % Fraction of CD16 <sup>+</sup> cells, %	7,19 ± 1,4	0,27 ± 0,1	0,26 ± 0,1	0,53 ± 0,1	0,44 ± 0,1	0,41 ± 0,1	0,45 ± 0,1	1,12 ± 0,2	0,29 ± 0,1	0,43 ± 0,1			

Таблица 2. Цитотоксичность в отношении культуры HG3, %, соотношение Э:М 5:1;  $p < 0,05$ Table 2. Cytotoxicity against HG3 culture, %, E:M ratio 5:1;  $p < 0.05$ 

Показатель Indicator	Культивирование в присутствии интерлейкина (ИЛ) Cultivation in the presence of interleukin (IL)		
	ИЛ-2 IL-2	ИЛ-2 + ИЛ-15 IL-2 + IL-15	ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 IL-2 + IL-15 + IL-21
Свежевыделенные мононуклеарные клетки Fresh peripheral blood mononuclear cells	52,5 ± 4,6		
Дни культивирования Days of cultivation			
7-й 7 <sup>th</sup>	54 ± 5,7	52,7 ± 6,0	59,3 ± 6,2
14-й 14 <sup>th</sup>	70,2 ± 7,0	55,3 ± 5,8	76,8 ± 6,0
21-й 21 <sup>st</sup>	72,4 ± 5,8	60,1 ± 5,2	78,9 ± 4,6

при воздействии ИЛ-2 + ИЛ-15 + ИЛ-21 связана, по-видимому, с пропорциональным увеличением в процентном соотношении доли данной популяции. Важно отметить, что при указанном режиме культивирования наблюдается снижение экспрессии НКp30-рецептора как на CD3<sup>+</sup>-, так и на CD56<sup>+</sup>-лимфоцитах, но данная первичная культура лимфоцитов обладает наивысшей цитотоксичностью по сравнению с 2 другими анализируемыми группами. Возможно, возрастание эффекторной функции связано с пролиферацией НКТ-клеток, обладающих цитотоксичностью и экспрессирующих активационный маркер NKG2D.

Активирующее воздействие ИЛ-21 на различные популяции клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета описано в ряде отечественных и зарубежных научных публикаций [19, 20]. По данным литературы, при воздействии ИЛ-21 на НК-клетки наблюдаются их пролиферация, созревание и выживаемость, а также повышение противоопухолевой активности [21]. ИЛ-21 поддерживает пролиферацию НКТ-клеток, усиливает противоопухолевую активность и формирует долгоживущую популяцию CD62L<sup>+</sup>-НКТ-клеток [22].

Согласно полученным данным, культивирование в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 вызывает более выраженную пролиферацию клеток (по сравнению с лимфоцитами, культивируемыми в присутствии только ИЛ-2), по-видимому, пропорционально стимулируя как Т-лимфоциты, так и НКТ-клетки. Тем не менее в присутствии комбинации ИЛ-2 и ИЛ-15 наблюдается более низкая цитотоксичность культивируемых

лимфоцитов по сравнению с другими вариантами эксперимента, что может быть связано с истощением клеточной популяции [23]. Исходя из данных литературы, добавление в культуральную среду ИЛ-21 нивелирует данное отрицательное воздействие ИЛ-15 [21], что также подтверждается в нашем исследовании.

### Заключение

Таким образом, длительное культивирование в присутствии необлученных аутологичных фидерных клеток обладает определенными преимуществами. Так, активированные Т-клетки положительно влияют на пролиферацию НК- и НКТ-клеток посредством продукции спектра активирующих цитокинов. Использование самого распространенного способа для *ex vivo* активации Т-клеток, МАТ к CD3- и CD28-рецепторам нацелено исключительно на активацию лимфоцитов, имеющих Т-клеточный рецептор: Т- и НКТ-клеток. Такой подход приводит к ограниченной и в процентном соотношении незначительной экспансии НК-клеток относительно пролиферации Т- и НКТ-клеток. Использование комбинации цитокинов, состоящей из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, а также длительный режим культивирования положительно влияют на пролиферацию, экспрессию активационных маркеров и выживаемость НКТ-клеток. Согласно данным научной литературы по искомой тематике, для максимально эффективного получения популяции НК-клеток требуется использование облученных фидерных клеток опухолевого происхождения либо других протоколов экспансии.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Poorebrahim M., Abazari M.F., Sadeghi S. et al. Genetically modified immune cells targeting tumor antigens. *Pharmacol Ther* 2020;214:107603. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107603
- Wang X., Yang X., Yuan X. et al. Chimeric antigen receptor-engineered NK cells: new weapons of cancer immunotherapy with great potential. *Exp Hematol Oncol* 2022;11(1):85. DOI: 10.1186/s40164-022-00341-7
- Abramson J.S., Palomba M.L., Gordon L.I. et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet* 2020;396(10254):839–52. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31366-0
- Maalej K.M., Merhi M., Inchakalody V.P. et al. CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. *Mol Cancer* 2023;22(1):20. DOI: 10.1186/s12943-023-01723-z
- Wang E., Cesano A., Butterfield L.H. et al. Improving the therapeutic index in adoptive cell therapy: key factors that impact efficacy. *J Immunother Cancer* 2020;8(2):e001619. DOI: 10.1136/jitc-2020-001619
- Liu Z., Zhou Z., Dang Q. et al. Immunosuppression in tumor immune microenvironment and its optimization from CAR-T cell therapy. *Theranostics* 2022;12(14):6273–90. DOI: 10.7150/thno.76854
- Shah N., Li L., McCarty J. et al. Phase I study of cord blood-derived natural killer cells combined with autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2017;177(3):457–66. DOI: 10.1111/bjh.14570
- Khawar M.B., Sun H. CAR-NK cells: from natural basis to design for kill. *Front Immunol* 2021;12:707542. DOI: 10.3389/fimmu.2021.707542
- Peng L., Sferruzza G., Yang L. et al. CAR-T and CAR-NK as cellular cancer immunotherapy for solid tumors. *Cell Mol Immunol* 2024;21(10):1089–108. DOI: 10.1038/s41423-024-01207-0
- Shimasaki N., Jain A., Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 2020;19(3):200–18. DOI: 10.1038/s41573-019-0052-1
- Wolf B.J., Choi J.E., Exley M.A. Novel approaches to exploiting invariant NKT cells in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2018;9:384. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00384
- Peighambarzadeh F., Najafalizadeh A., Esmail N. et al. Optimization of *in vitro* expansion and activation of human natural killer cells against breast cancer cell line. *Avicenna J Med Biotechnol* 2020;12(1):17–23.
- Sivori S., Pende D., Quatrini L. et al. NK cells and ILCs in tumor immunotherapy. *Mol Aspects Med* 2021;80:100870. DOI: 10.1016/j.mam.2020.100870
- Koehl U., Brehm C., Huenecke S. et al. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* 2013;3:118. DOI: 10.3389/fonc.2013.00118
- Conlon K.C., Lugli E., Welles H.C. 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. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.3329
- McMichael E.L., Jaime-Ramirez A.C., Guenterberg K.D. et al. IL-21 enhances natural killer cell response to cetuximab-coated pancreatic tumor cells. *Clin Cancer Res* 2017;23(2):489–502. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0004
- Sivonen M., Sirviö K.A., Wojciechowski S. et al. Cytokines impact natural killer cell phenotype and functionality against glioblastoma *in vitro*. *Front Immunol* 2023;14:1227064. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1227064
- Koh E.K., Lee H.R., Son W.C. et al. Antitumor effects of NK cells expanded by activation pre-processing of autologous feeder cells before irradiation in colorectal cancer. *Oncol Lett* 2023;25(6):232. DOI: 10.3892/ol.2023.13818
- Трошина Е.А. Роль цитокинов в процессах адаптивной интеграции иммунных и нейроэндокринных реакций организма. *Проблемы эндокринологии* 2021;67(2):4–9. DOI: 10.14341/probl12744
- Трошина Е.А. The role of cytokines in the processes of adaptive integration of immune and neuroendocrine reactions of the human body. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology* 2021;67(2):4–9. (In Russ.). DOI: 10.14341/probl12744
- Leonard W.J., Wan C.K. IL-21 Signaling in immunity. *F1000Res* 2016;5:F1000 Faculty Rev-224. DOI: 10.12688/f1000research.7634.1
- Shanley M., Daher M., Dou J. et al. Interleukin-21 engineering enhances NK cell activity against glioblastoma via CEBPD. *Cancer Cell* 2024;42(8):1450–66.e11. DOI: 10.1016/j.ccell.2024.07.007
- Liu Y., Dang Y., Zhang C. et al. IL-21-armored B7H3 CAR-iNKT cells exert potent antitumor effects. *iScience* 2023;27(1):108597. DOI: 10.1016/j.isci.2023.108597
- Felices M., Lenvik A.J., McElmurry R. et al. Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect. *JCI Insight* 2018;3(3):e96219. DOI: 10.1172/jci.insight.96219

**Вклад авторов**

П.О. Фёдорова: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

И.О. Чикилева: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи.

**Author's contributions**

P.O. Fedorova: obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript;

I.O. Chikileva: research design development, analysis of the obtained data (including statistical), review of publications on the topic of the article.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

П.О. Фёдорова / P.O. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0001-7478-8783>

И.О. Чикилева / I.O. Chikileva: <https://orcid.org/0000-0003-0769-1695>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования данной экспериментальной работы.

**Funding.** The authors declare no funding for this experimental work.

**Статья поступила:** 21.01.2025. **Принята в печать:** 13.05.2025. **Опубликована онлайн:** 27.06.2025.

**Article submitted:** 21.01.2025. **Accepted for publication:** 13.05.2025. **Published online:** 27.06.2025.