

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ (IL-2, IL-7, IL-15) НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Тимофеева С.В., Ситковская А.О., Филиппова С.Ю., Златник Е.Ю., Вашченко Л.Н., Кечеджиева Э.Э., Дашкова И.Р., Аушева Т.В.

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: timofeeva.sophia@gmail.com

Целью настоящего исследования была оценка комбинированного воздействия цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на пролиферацию лимфоцитов в условиях *in vitro* у пациентов с диагнозом «рак молочной железы». Исследование было выполнено на 10 образцах крови больных раком молочной железы. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из крови методом центрифугирования в градиенте плотности фиколюрографин. Клетки культивировали в равной посевной доле по 500 тыс. клеток/мл на 6-луночных планшетах в течение 15 суток при 37°C с содержанием CO₂. Для активации лимфоцитов использовали анти-биотиновые магнитные частицы MACSiBead и антитела к CD2, CD3 и CD28 (MiltenyiBiotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Экспансию лимфоцитов проводили на 4-е, 8-е и 12-е сутки в присутствии различных сочетаний рекомбинантных γ с-цитокинов – IL-2, IL-7, IL-15 (MiltenyiBiotec, Германия) с применением отрицательного контроля. Ежедневный подсчет жизнеспособных лимфоцитов осуществлялся на анализаторе (Eve, NanoEnTekInc, Корея). В пробах с добавлением комбинаций IL-2, IL-7, IL-15 наблюдались повышение уровня пролиферации лимфоцитов в сравнении с контролем, а также образование конгломератов, что косвенно свидетельствует о влиянии γ с-цитокинов на процессы созревания и дифференцировки лимфоцитов во время экспансии в условиях культивирования *in vitro*. При сравнительном анализе действия γ с-цитокинов на выживаемость лимфоцитов, полученных от больных раком молочной железы, достоверные отличия наблюдались в пробах с присутствием IL-15. Таким образом, несмотря на анализ только культурального этапа, полученные нами экспериментальные данные могут иметь значение для оценки возможности применения IL-2, IL-7, IL-15 в лечении пациентов с диагнозом «рак молочной железы».

Ключевые слова: экспансия лимфоцитов, рак молочной железы, IL2, IL7, IL15.

EFFECT OF CYTOKINES (IL-2, IL-7, IL-15) UPON PROLIFERATION OF LYMPHOCYTES *IN VITRO* IN BREAST CANCER PATIENTS

Timofeeva S.V., Sitkovskaya A.O., Filippova S.Yu., Zlatnik E.Yu., Vashchenko L.N., Kechedzhieva E.E., Dashkova I.R., Ausheva T.V.

«National Medical Research Centre for oncology», Rostov-on-Don, e-mail: timofeeva.sophia@gmail.com

The aim of this study was to evaluate the combined effect of cytokines (IL-2, IL-7, IL-15) on lymphocytes proliferation *in vitro* in breast cancer patients. The study was carried out on 10 blood samples from breast cancer patients and included the isolation of mononuclear cells (MNCs) by centrifugation in a density gradient ficoll-urografin. The cells were cultured in an equal seeding fraction of 500 thousand cells / ml in 6-well plates for 15 days. at 37 ° C with CO₂ content. Anti-biotin magnetic particles MACSiBead and antibodies to CD2, CD3, and CD28 (MiltenyiBiotec, Germany) were used to activate lymphocytes, according to the manufacturer's protocol. Expansion of lymphocytes was carried out on the 4th, 8th and 12th day with combinations of recombinant cytokines – IL-2, IL-7, IL-15 (MiltenyiBiotec, Germany) using a negative control. Daily counting of viable lymphocytes was performed at analyzer (Eve, NanoEnTekInc, Korea). In samples with a combination of IL-2, IL-7, IL-15, an increase in the level of lymphocyte proliferation was observed in comparison with the control, as well as the formation of conglomerates, which indirectly indicates the effect of γ с-цитокинов. about the processes of maturation and differentiation of lymphocytes during reproduction under conditions of *in vitro* cultivation. Comparative analysis of the effect of γ с-цитокинов on the survival of lymphocytes obtained from breast cancer patients performed significant differences in the samples with IL-15. Despite, only the cultivation analysis, our experimental data are of great importance for the treatment of breast cancer patients by IL-2, IL-7, IL-15.

Keywords: expansion, breast cancer, IL-2, IL-7, IL-15.

За последнее десятилетие использование адоптивной иммунотерапии стало многообещающим методом лечения широкого спектра злокачественных новообразований, в

частности рака молочной железы (РМЖ) [1, 2]. Современные иммунотерапевтические подходы для лечения РМЖ основаны на способности иммунной системы устранять опухолевые клетки, оставляя при этом здоровые ткани нетронутыми [3]. Одним из таких современных методов лечения является иммунотерапия на основе цитокинов. Цитокины как белки иммунной системы способны модулировать иммунный ответ хозяина и напрямую вызывать гибель опухолевых клеток, поэтому некоторые из цитокиновых препаратов применяют в качестве иммунотерапии при ряде заболеваний, а также в качестве адъювантов при вакцинации. Однако монотерапия низкими дозами цитокинов не дает значимых терапевтических результатов, а лечение высокими дозами приводит к ряду побочных эффектов, в связи с чем возникает вопрос об оптимизации доз и комбинаций цитокинов. Поэтому необходимо исследовать влияние цитокинов на иммунные клетки, которые участвуют в механизмах регуляции про- и противоопухолевого иммунного ответа [4].

Согласно данным современных исследований цитокины влияют на развитие, дифференцировку и гомеостаз лимфоцитов. Цитокины I типа (IL-2, IL-7 и IL-15) имеют общую γ -цепь (γ -chain) рецепторов и разнонаправленно действуют на процессы, связанные с жизнеспособностью, активацией и клональной экспансией лимфоцитов, а также с развитием и поддержанием клеток памяти [5]. Несмотря на плеiotропность цитокинов и сходство в сигнальных путях, γ -цитокины способны проявлять различное действие на разные субпопуляции Т-клеток: IL-2 играет основную роль в развитии и поддержании регуляторных Т-клеток [6], IL-7 опосредует гомеостаз наивных CD4 + и CD8 + Т-клеток и клеток памяти, а IL-15 стимулирует пролиферацию и цитотоксические функции CD8+ Т-клеток и NK-клеток, что приводит к усилению противоопухолевого ответа [7]. Пути передачи сигналов IL-2, IL-7 и IL-15 рассматриваются в литературе в качестве мишеней иммунотерапевтических стратегий [8].

Для успешной адоптивной иммунотерапии необходимо добиться адекватного количества и качества лимфоцитов. Первое обусловлено возможностью их экспансии *in vitro*, второе – преимущественной стимуляцией цитотоксических субпопуляций, таких как NK-клетки CD8+ Т-лимфоциты.

Ранее в проведенном нами исследовании влияния IL-2, IL-7, IL-15 и их комбинаций на пролиферацию натуральных киллеров, сепарированных из крови больных раком молочной железы, максимальная стимуляция *in vitro* была зафиксирована в пробах с внесенным IL-15 и комбинациями γ -цитокинов, включающих его.

Целью настоящего исследования была оценка комбинированного воздействия цитокинов (IL-2, IL-7, IL-15) на пролиферацию лимфоцитов в условиях *in vitro* у пациентов с диагнозом «рак молочной железы».

Материалы и методы исследования. Работа была одобрена этическим комитетом НМИЦ онкологии Минздрава России, протокол № 33/1 от 29.11.2018 г. Пациенты подписывали информированное согласие о принятии участия в исследовании.

В качестве материала для исследования использовали мононуклеарные клетки (МНК) периферической венозной крови от 10 больных местно-распространенным раком молочной железы I–III стадии. Забор крови осуществляли из локтевой вены в объеме 32 мл в пробирки для выделения МНК (BD Vacutainer® СРТ™, США). Полученные клетки культивировали в равной посевной дозе по 500 тыс. клеток/мл в 6-луночных планшетах (Biofil, Китай) в питательной среде RPMI 1640 (Gibco, США) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США) при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализатора (Eve, NanoEnTekInc, Корея).

Экспансию лимфоцитов проводили с использованием буфера в концентрации 10 мкг/мл, содержащего анти-биотиновые магнитные частицы MACSiBead и антитела к CD2, CD3 и CD28 (MiltenyiBiotec, Германия), в соответствии с протоколом производителя.

Индукцию пролиферации лимфоцитов выполняли на 4-е, 8-е и 12-е сутки внесением рекомбинантных цитокинов – IL-2, IL-7, IL-15 (MiltenyiBiotec, Германия) и их комбинаций. Отрицательным контролем являлись пробы лимфоцитов после экспансии *in vitro* без внесения цитокинов. Цитокины вносили в концентрации 40 нг/мл каждый в следующих вариантах: IL-2; IL-2/IL-15; IL-2/IL-15/IL-7; IL-15; IL-15/IL-7. Планшеты с клеточной суспензией культивировали при 37°C в среде с содержанием CO₂ в течение 15 суток. В каждой пробе ежедневно оценивали жизнеспособность клеток в суспензии на анализаторе (Eve, NanoEnTekInc, Корея), а также морфологию с помощью инвертированного микроскопа (AxioImagerA.2 Zeiss, Германия).

Оценку статистической достоверности различий в показателях между группами определяли по t-критерию Стьюдента. Данные выражали как средние значения ± ошибка среднего (M±m). Количество клеток в первые сутки культивирования соответствовало посевной дозе и принималось за 100%.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты нашего исследования показали, что во всех пробах после проведенной экспансии прирост клеток и его спад происходили равномерно вплоть до 11-х суток сокультивирования. В опытных образцах с цитокинами количество жизнеспособных клеток продолжало увеличиваться, а в контроле неизменно снижалось.

Полученные данные на 11-е сутки инкубации показали статистически достоверные различия в пробах с добавлением комбинации интерлейкинов IL-7 и IL-15 по сравнению с контролем в 1,5 раза (p<0,05). На 12-е сутки сокультивирования доля лимфоцитов в пробах с

добавлением только IL-15 и комбинации IL-7/IL-15 была выше в 1,47 и 1,6 раза соответственно по сравнению с контролем ($p<0,05$).

После окончания срока культивирования (15 суток) все опытные пробы статистически достоверно превышали контроль (292%), а именно присутствие IL-2 (658%) приводило к увеличению количества жизнеспособных клеток в 2,25 раза, добавление комбинации IL-2/IL-15 (680%) – в 2,33 раза, комбинации цитокинов IL-2/IL-7/IL-15 (704%) – в 2,4 раза, действие IL-15 (824%) и комбинации IL-7/15 (838%) – в 2,9 раза ($p<0,05$). Результаты количественного состава лимфоцитов с добавлением различных комбинаций цитокинов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Количественный состав лимфоцитов на фоне экспансии в условиях культивирования с IL-2, IL-7, IL-15 *in vitro* (%)

Проба	Прирост лимфоцитов в период культивирования (%)									
	2 сут.	3 сут.	4 сут.	5 сут.	8 сут.	9 сут.	10 сут.	11 сут.	12 сут.	15 сут.
Контроль	169± 32,3	214± 37,7	193± 37,1	360± 93,3	471± 91,5	551± 77,5	433± 71,5	524± 71,9	476± 60,9	292± 59,2
IL-2	165± 36,8	217± 44,9	178± 35,9	296± 73,8	412± 98,4	501± 95,2	368± 65,8	608± 52,9	658± 76,1	658± 61,3*
IL-2/15	176± 43,5	232± 44,0	192± 36,4	294± 69,5	497± 88,1	552± 94,4	438± 73,1	706± 72,8	664± 97,9	680± 58,1*
IL-2/7/15	144± 31,7	241± 44,6	181± 36,1	292± 75,9	420± 74,5	477± 86,2	413± 60,8	644± 70,3	632± 66,1	704± 47,5*
IL-15	170± 38,8	220± 50,9	165± 29,7	318± 82,1	530± 76,4	509± 89,5	460± 79,7	674± 61,5	702± 72,6*	824± 66,3*
IL-7/15	178± 37,0	270± 66,3	196± 44,9	342± 92,5	470± 85,7	526± 89,6	466± 83,1	778± 72,2*	756± 99,3*	838± 94,6*

* – статистически достоверные различия с контролем ($p<0,05$). Количество клеток в первые сутки культивирования соответствовало посевной дозе и принималось за 100%.

Добавление в среду культивирования IL-15 значительно увеличивало прирост лимфоцитов по сравнению с другими пробами. Действие только IL-2 на прирост лимфоцитов было менее выраженным по сравнению с пробами, в которых присутствовали IL-15 и IL-7.

Важно отметить, что на 3-и сутки культивирования наблюдали активный рост количества лимфоцитов, а уже на 4-е сутки во всех пробах было отмечено резкое снижение числа жизнеспособных клеток. Эти данные позволяют предположить, что добавление

цитокинов на 3-и сутки культивирования в фазу экспоненциального роста клеток может положительно повлиять на уровень дальнейшего прироста биоматериала.

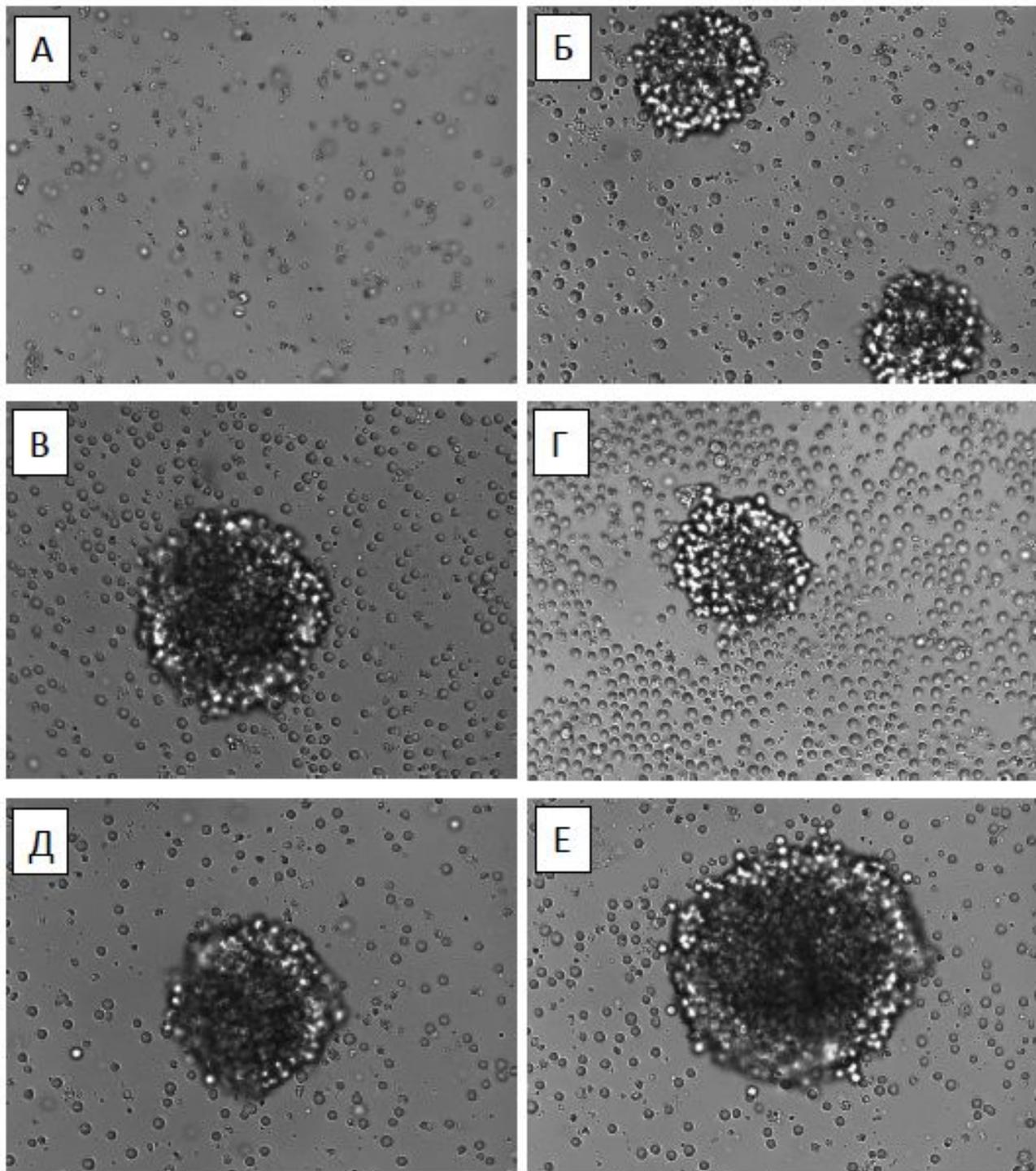


Рис. 1. Культивирование лимфоцитов после экспансии с цитокинами IL-2, IL-7, IL-15, 11 суток. А – контроль, Б – IL-2, В – IL-2/IL-15, Г – IL-7/IL-15, Д – IL-2/IL-7/IL-15, Е – IL-15

На протяжении всего срока культивирования было зафиксировано образование клеточных конгломератов в пробах с добавлением γ -цитокинов (рис. 1). Клеточные

конгломераты имели сферическую форму и различались размером в зависимости от вносимых в пробу цитокинов. Так, наименьшие размеры конгломератов были отмечены в образцах только с IL-2 (диаметр $93,2 \pm 6,1$ мкм) и смесью IL-7/IL-15 (диаметр $87,4 \pm 5,9$ мкм). Незначительные различия в размере клеточных структур наблюдали в образцах с IL-2/IL-15 (диаметр $107,4 \pm 8,7$ мкм) и IL-2/IL-7/IL-15 (диаметр $118,1 \pm 6,3$ мкм). Максимальных размеров достигали конгломераты из лимфоцитов в пробах только с IL-15 (диаметр $147,3 \pm 7,1$ мкм). В применяемом нами протоколе экспансии (Miltenyi Biotec, Германия) указана возможность образования клеточных конгломератов. Интересным является отсутствие подобных структур в контрольном образце без добавления цитокинов, который также подвергался указанному протоколу экспансии. Возможно, присутствие цитокинов стимулировало клоногенность лимфоцитов. Однако не стоит исключать вынужденную агрегацию клеток ввиду высокой клеточной плотности, вызванной стимуляцией пролиферации лимфоцитов в опытных пробах с цитокинами.

Цитокины являются решающими факторами развития иммунных клеток *in vivo* и необходимы для генерации активированных лимфоцитов *ex vivo*. Интерлейкины I типа из семейства IL-2, IL-7, IL-15 играют важную роль в экспансии и пролиферативной активности лимфоцитов, а также являются регуляторами различных типов иммунных клеток, включая CD4+ Т-хелперы [9].

IL-2 представляет собой секретируемый цитокин и связывает заранее сформированные гетеротримерные рецепторы на поверхности активированных клеток. В исследовании *in vitro* было выявлено, что при определенном пороге концентрации IL-2 осуществляется реализация апоптоз-индуцирующего действия этого цитокина на лимфоциты крови [10]. В качестве одной из причин слабо выраженной пролиферации лимфоцитов в пробах с IL-2 в литературе рассматривается нарушение баланса системы IL-2/IL-7, функциями которой являются как подавление, так и активация Т-клеточного ответа для регуляции равновесия между иммунитетом и толерантностью [11]. Вместе с тем по данным литературной периодики IL-2 способствует активации Т-лимфоцитов CD8+ и является фактором роста Т-лимфоцитов CD4+, а также натуральных киллеров (NK). IL-2 также используется в качестве адьюванта при лечении пациентов с меланомой, прогрессирующим колоректальным раком или раком яичников аутологичными дендритными клетками, стимулируемыми аутологичным опухолевым лизатом. По данным клинических исследований добавление IL2 в схему лечения способно повысить эффективность терапии за счет индукции экспансии опухолевого антигена, представленного Т-клетками [12].

Впервые IL-7 был определен как фактор роста, ответственный за стимулирование пролиферации предшественников В-клеток мыши в системе длительного

культивирования костного мозга. Тем не менее позже были представлены результаты исследований, которые свидетельствуют, что IL-7 также содействует развитию лимфоцитов и регулирует популяции периферических Т-клеток [9]. IL-7, сформировав высокоаффинный связывающий комплекс, передает сигналы через Jak1 / Jak3 / STAT5 и пути передачи сигналов PI3K-AKT [13]. Эти пути являются общими с IL-2, несмотря на то, что каждый цитокин имеет свои особенности в регуляции различных клеток иммунной системы [11].

IL-15 в основном связан с мембраной и индуцирует передачу сигналов при межклеточном контакте в иммунологическом синапсе. Перспективность применения IL-15 связана с описанными у него свойствами стимулировать пролиферацию и цитотоксические функции CD8+ Т-клеток и NK-клеток, что приводит к усилению противоопухолевого ответа [14, 15]. Кроме того, было установлено, что IL-2, IL-17, IL-15 играют важную роль в пролиферации и жизнеспособности периферических Т-клеток, повышая регуляцию PD-1 и PD-L1 на очищенных Т-клетках *in vitro*. Этот эффект был наиболее выраженным на Т-клетках памяти. При этом эти цитокины косвенно индуцировали экспрессию PD-L1 и PD-L2 на моноцитах/макрофагах в МНК [6]. Если подобное действие будет отмечено на опухолевых клетках, это позволит повысить их чувствительность к иммунотерапии ингибиторами контрольных точек. В современной клинической практике IL-15 активно используется для активации и размножения NK-клеток, которые затем трансплантируются пациентам с лейкемией или солидными опухолями, а также для стимулирования пролиферации Т-клеток химерного антигенного рецептора (CAR) в сочетании с IL2. В недавнем клиническом испытании клетки анти-CD19 CAR-NK, кодирующие ген человеческого IL15, использовали для лечения пациентов с рецидивирующим или рефрактерным CD19-положительным раком. Большинство пациентов ответили на лечение клетками CAR-NK без развития серьезных токсических эффектов [4].

Заключение

Невзирая на обширные исследования в области адоптивной иммунотерапии, результаты об участии γ с-цитокинов I типа (IL-2, IL-7 и IL-15) в процессе регуляции выживаемости и пролиферации лимфоцитов пока не нашли выхода в клиническую практику.

Нами получена экспансия *in vitro* лимфоцитов больных раком молочной железы, наиболее ранняя и наиболее выраженная при использовании IL-7/IL-15 и одного IL-15. Несмотря на анализ только культурального этапа, полученные данные могут иметь значение для оценки возможности применения γ с-цитокинов в лечении пациентов с диагнозом «рак молочной железы».

Список литературы

1. Златник Е.Ю., Ситковская А.О., Непомнящая Е.М., Джандигова Ф.Р., Ващенко Л.Н. Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей // Казан. мед. журнал. 2018. Т. 99. № 5. С. 792-801.
2. Шамова Т.В., Ситковская А.О., Ващенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э. Адоптивная клеточная терапия: достижения последних лет // Южно-российский онко. журн. 2020. Т. 1. № 1. С. 43-59.
3. Zarogoulidis P., Lampaki S., Yarmus L., Kioumis I., Pitsiou G., Katsikogiannis N., Hohenforst-Schmidt W., Li Q., Huang H., Sakkas A., Organtzis J., Sakkas L., Mpoukovinas I., Tsakiridis K., Lazaridis G., Syrigos K., Zarogoulidis K. Interleukin-7 and interleukin-15 for cancer. *J Cancer*. 2014. vol. 9. no. 5. P. 765-773. DOI:10.7150/jca.10471.
4. Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., Green A.R., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Molecular Aspects and future perspectives of cytokine-based anti-cancer Immunotherapy. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. vol. 402. no. 8. DOI:10.3389/fcell.2020.00402.
5. Gong W., Hoffmann J.M., Stock S., Wang L., Liu Y., Schubert M.L., Neuber B., Hückelhoven-Krauss A., Gern U., Schmitt A., Müller-Tidow C., Shiku H., Schmitt M., Sellner L. Comparison of IL-2 vs IL-7/IL-15 for the generation of NY-ESO-1-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2019. vol. 68. no. 7. P. 1195-1209. DOI:10.1007/s00262-019-02354-4.
6. Kinter A.L., Godbout E.J., McNally J.P., Sereti I., Roby G.A., O'Shea M.A., Fauci A.S. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J. of immunology.* 2008. vol. 181. no. 10. P. 6738-6746. DOI:10.4049/jimmunol.181.10.6738.
7. Bellelis P., Frediani Barbeiro D., Gueuvoghlian-Silva B.Y., Kalil J., Abrão M.S., Podgaec S. Interleukin-15 and Interleukin-7 are the major cytokines to maintain endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation.* 2019. vol. 84. no. 5. P. 435-444. DOI:10.1159/000496607.
8. Waldmann T.A. The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy. *Cancer Immunol Res.* 2015. vol. 3. no. 3. P. 219-227. DOI:10.1158/2326-6066.
9. Read K.A., Powell M.D., McDonald P.W., Oestreich K.J. IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4(+) T helper cell differentiation. *Exp. Hematol.* 2016. vol. 44. no. 9. P. 799-808. DOI:10.1016/j.exphem.2016.06.003.
10. Conlon K.C., Miljkovic M.D., Waldmann T.A. Cytokines in the treatment of cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* 2019. vol. 39. no. 1. P. 6-21. DOI:10.1089/jir.2018.0019.

11. Katzman S.D., Hoyer K.K., Doods H., Gratz I.K., Rosenblum M.D., Paw J.S., Isakson S.H., Abbas A.K. Opposing functions of IL-2 and IL-7 in the regulation of immune responses. *Cytokine*. 2011. vol. 56. no. 1. P. 116-121. DOI:10.1016/j.cyto.2011.07.005.
12. Boyman O., Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature reviews. Immunology*. 2012. vol. 12. no. 3. P. 180-190. DOI: 10.1038/nri3156.
13. Carrette F, Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Semin Immunol*. 2012. vol. 24. no. 3. P. 209-217. DOI: 10.1016/j.smim.2012.04.010.
14. Robinson T.O., Schluns K.S. The potential and promise of IL-15 in immuno-oncogenic therapies. *Immunol Lett*. 2017. no. 190. P. 159-168. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.08.010.
15. Dwyer C.J., Knochelmann H.M., Smith A.S., Wyatt M.M., Rangel Rivera G.O., Arhontoulis D.C., Bartee E., Li Z., Rubinstein M.P., Paulos C.M. Fueling Cancer Immunotherapy with Common Gamma Chain Cytokines. *Front Immunol*. 2019. vol. 10. no. 263. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00263.