
БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 616.155.392-036.11:[612.112.94:615.37]

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ФИДЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫЕ ФОРМЫ ИЛ-12 И ИЛ-18, ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК

А. С. МУХАМЕТШИНА¹⁾, А. А. МИГАС¹⁾,
А. В. КЛЫЧ¹⁾, Е. А. ЛАСЮКОВ¹⁾, Т. В. ШМАН¹⁾

¹⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский район, Беларусь

Образец цитирования:

Мухаметшина АС, Мигас АА, Клыч АВ, Ласюков ЕА, Шман ТВ. Получение новых фидерных клеточных линий, экспрессирующих мембранно-связанные формы ИЛ-12 и ИЛ-18, для улучшения противоопухолевых свойств естественных киллерных клеток. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;1:33–40.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2023-1-33-40>

For citation:

Mukhametshyna NS, Migas AA, Klych HV, Lasiukov YA, Shman TV. Obtaining new feeder cell lines expressing membrane-bound forms of IL-12 and IL-18 to improve the anti-tumor properties of natural killer cells. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;1:33–40. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2023-1-33-40>

Авторы:

Анастасия Станиславовна Мухаметшина – младший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований.

Александр Александрович Мигас – заведующий лабораторией иммунологических исследований.

Анна Васильевна Клыч – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.

Евгений Анатольевич Ласюков – младший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований.

Татьяна Викторовна Шман – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований.

Authors:

Nastassia S. Mukhametshyna, junior researcher at the laboratory of immunological research.

mukhametshyna_n@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0002-0029-1499>

Alexander A. Migas, head of the laboratory of immunological research.

alexandr.migas.work@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7013-9847>

Hanna V. Klych, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.

hannaklych@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-2898-2419>

Yauheni A. Lasiukov, junior researcher at the laboratory of immunological research.

zhenya_lasyukov@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4183-0134>

Tatsiana V. Shman, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of immunological research.

t_shman@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0001-8669-8005>

В настоящее время проводятся многочисленные клинические исследования по использованию естественных киллерных клеток в терапии онкологических заболеваний и солидных опухолей. Однако такая иммунотерапия может быть ограничена непродолжительной персистенцией естественных киллерных клеток в организме реципиента и способностью опухолевых клеток избегать распознавания естественными киллерными клетками. Решение этих проблем путем модификации исходных свойств естественных киллерных клеток может существенно повысить эффективность противоопухолевой терапии. Одним из способов модификации является использование новых фидерных клеточных линий, экспрессирующих различные комбинации мембранно-связанных цитокинов (ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21), для получения естественных киллерных клеток с особым фенотипом (*memory-like*). В ходе проведенного исследования получены две новые фидерные клеточные линии на основе клеток линии К-562 с эктопической экспрессией комбинаций цитокинов ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-18 и ИЛ-21, ИЛ-12, ИЛ-18 для экспансии естественных киллерных клеток с усиленной противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: естественные киллерные клетки; интерлейкины; фидерные клеточные линии; острый лейкоз; иммунотерапия.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы «Научные технологии и техника» на 2021–2025 гг. (подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии», задача 5).

OBTAINING NEW FEEDER CELL LINES EXPRESSING MEMBRANE-BOUND FORMS OF IL-12 AND IL-18 TO IMPROVE THE ANTI-TUMOR PROPERTIES OF NATURAL KILLER CELLS

N. S. MUKHAMETSHYNA^a, A. A. MIGAS^a,
H. V. KLYCH^a, Y. A. LASIUKOV^a, T. V. SHMAN^a

^aBelarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Baraŭliany 223053, Minsk District, Belarus

Corresponding author: N. S. Mukhametshyna (mukhametshyna_n@yahoo.com)

Numerous clinical studies are currently underway on the use of natural killer cells in the treatment of cancer and solid tumors. However, such immunotherapy may be limited by the short persistence of natural killer cells in the host body and the ability of tumor cells to avoid recognition by natural killer cells. Solving these problems by modifying the initial properties of natural killer cells can significantly increase the effectiveness of antitumor therapy. One of the methods of modification is the use of new feeder cell lines expressing various combinations of membrane-bound cytokines (IL-12, IL-15, IL-18, IL-21) to obtain natural killer cells with a specific phenotype (*memory-like*). In the course of the work done, two new feeder cell lines based on K-562 cells with ectopic expression of a combination of interleukins IL-15, IL-12, IL-18 and IL-21, IL-12, IL-18 were obtained for the expansion of natural killer cells with enhanced antitumor activity.

Keywords: natural killer cells; interleukins; feeder cell lines; acute leukemia; immunotherapy.

Acknowledgements. The work was funded by the state program «Science-intensive technologies and equipment» for 2021–2025 (subprogram 1 «Innovative biotechnologies», task 5).

Введение

На сегодняшний день клеточная терапия активно внедряется в схемы лечения различных заболеваний, в том числе онкологических. Основной функцией естественных киллерных (ЕК) клеток, которые относятся к группе клеток врожденного иммунитета, является защита организма от вирусов и опухолевой трансформации [1]. В настоящее время проводятся многочисленные клинические исследования по использованию ЕК-клеток в терапии онкологических заболеваний и солидных опухолей [2]. Преимущество применения ЕК-клеток в онкологии заключается в их врожденной высокой противоопухолевой активности, а также безопасности для пациента даже при использовании аллогенных ЕК-клеток. Однако успешное применение ЕК-иммунотерапии ограничивается рядом факторов, в частности непродолжительной персистенцией ЕК-клеток в организме реципиента и способностью опухолевых клеток избегать распознавания ЕК-клетками. Решение указанных проблем путем модификации исходных свойств ЕК-клеток может существенно повысить эффективность противоопухолевой терапии. Ранее авторами были получены два варианта генетически модифицированных фидерных клеточных линий на основе клеток линии К-562 – сублиния FD15, экспрессирующая рекомбинантный белок 4-1BBL и ИЛ-15, и сублиния FD21, экспрессирующая рекомбинантный белок 4-1BBL и ИЛ-21 [3].

Цель исследования – получить новые фидерные клеточные линии с эктопической экспрессией комбинаций мембранно-связанных цитокинов ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-18 и ИЛ-21, ИЛ-12, ИЛ-18 для приобретения ЕК-клетками особого фенотипа (*memory-like*) [4]. Одной из особенностей таких клеток является более длительная персистенция *in vivo* и усиленная противоопухолевая активность, характеризующаяся повышенной продукцией IFN- γ [5].

Таким образом, актуальность работы обусловлена необходимостью исследовать методологические подходы, позволяющие модифицировать ЕК-клетки для усиления их противоопухолевых свойств и дальнейшего применения в иммунотерапии онкологических заболеваний.

Материалы и методы исследования

Клеточные линии. В работе использовались следующие клеточные линии:

- К-562 – иммортализованная клеточная линия хронического миелоидного лейкоза человека;
- НЕК-293Т – иммортализованная клеточная линия эмбриональной почки человека;
- 4-1BBL-mbIL-15 – производная клеточной линии К-562, полученная путем генетической модификации и экспрессирующая полноразмерный белок 4-1BBL человека и рекомбинантную мембранно-связанную форму ИЛ-15 человека [3];
- 4-1BBL-mbIL-21 – производная клеточной линии К-562, полученная путем генетической модификации и экспрессирующая полноразмерный белок 4-1BBL человека и рекомбинантную мембранно-связанную форму ИЛ-21 человека [3].

Культивирование клеточных линий. Все этапы культивирования проводили в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере (95 %) при 5 % CO₂, температуре 37 °С. Линию клеток К-562 и ее производные культивировали в ростовой среде RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*, США), а линию НЕК-293Т – в полной ростовой среде DMEM (*Sigma-Aldrich*) с добавлением 10 % ЭТС, 2 ммоль/л L-глутамина, смеси антибиотиков и антимикотика (*Life Technologies*, США) в обоих случаях.

Получение рекомбинантных псевдотипированных лентивирусных частиц. Данный этап включал несколько стадий и осуществлялся по следующей схеме.

Котрансфекция клеток линии НЕК-293Т. За 24 ч до котрансфекции по 2 мл суспензии клеток линии НЕК-293Т в полной ростовой среде DMEM (плотность суспензии составляла $5 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл) вносили в лунки 6-луночного планшета для адгезивного культивирования клеток (*Sarstedt Group*, Германия), аккуратно перемешивали и проводили инкубирование планшета. Спустя 24 ч размораживали плазмидные векторы, 2 моль/л раствор CaCl₂ и HBS-буфер. В стерильной пробирке типа «эппендорф» объемом 1,5 мл смешивали 0,6 мкг плазмидного вектора оболочки pMD2.G, 1 мкг пакующего плазмидного вектора pCMV_dR8.91, 1,8 мкг трансфер-плазмиды pWPXL, 9,25 мкл 2 моль/л CaCl₂, доводили объем раствора до 75 мкл на 1 лунку с помощью воды и перемешивали пипетированием. В отдельную пробирку объемом 1,5 мл наливали 75 мкл HBS-буфера. Содержимое пробирки с ДНК перемешивали и медленно по каплям, вортексируя с небольшой интенсивностью, добавляли в пробирку с HBS-буфером. Полученную смесь интенсивно перемешивали в течение 1 с и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Образовавшийся преципитат аккуратно перемешивали пипетированием и вносили к клеткам НЕК-293Т в количестве 150 мкл на 1 лунку, стараясь распределить его максимально равномерно по всей поверхности. Качество нанесенного на клетки преципитата оценивали с помощью инвертированного микроскопа, убеждаясь, что частицы преципитата распределены равномерно и не образуют агрегатов. После этого проводили инкубирование планшета. Через 12 ч жидкость из лунок удаляли с помощью аспиратора и вместо нее в каждую лунку по каплям вносили 1 мл среды Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*, США), после чего инкубировали планшет на протяжении 48 ч.

Сбор рекомбинантных псевдотипированных лентивирусных частиц. Супернатант собирали в пластиковую стерильную пробирку типа «фалькон» объемом 15 мл и пропускали через фильтр с размером пор 0,45 мкм (*Carl Roth*, Германия). Эффективность котрансфекции оценивали путем анализа снятых с лунок планшета клеток на проточном цитометре Cytomics FC 500 (*Beckman Coulter*, США).

Концентрирование рекомбинантных псевдотипированных лентивирусных частиц методом ультрацентрифугирования. Концентрирование рекомбинантных лентивирусов проводили в толсто-стенных открытых конических полиалломерных пробирках размером 11 × 34 мм (*Beckman Coulter*), оснащенных адаптерами (*Beckman Coulter*). Стерильную пробирку доверху (13 мл) заполняли осветленным супернатантом, содержащим рекомбинантные лентивирусы, ставили в держатель ротора MLA-55 (*Beckman Coulter*) и центрифугировали в препаративной ультрацентрифуге Optima MAX-XP (*Beckman Coulter*) при температуре 4 °С и ускорении 50 000 g на протяжении 90 мин. После завершения центрифугирования отбирали 150 мкл супернатанта, а все остальное аккуратно, но как можно более полно удаляли, затем ресуспендировали осадок рекомбинантных лентивирусов (не всегда заметен) отобраным супернатантом, который разаликовали по 50 мкл в пробирку типа «эппендорф» объемом 0,2 мл.

Определение титра рекомбинантных псевдотипированных лентивирусных частиц. За 24 ч до трансдукции по 0,5 мл суспензии клеток линии НЕК-293Т в полной ростовой среде DMEM (плотность суспензии составляла $1,2 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл) вносили в лунки 24-луночного планшета для адгезивного культивирования клеток (*Sarstedt Group*), при этом две лунки являлись контрольными, а четыре лунки использовались для разведения в соотношениях 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000. Далее проводили инкубирование планшета. Через 24 ч определяли количество клеток в лунках. Для этого в одной из контрольных лунок клетки переводили в суспензию, которую использовали для подсчета клеток в камере Горяева. В остальные лунки вносили анализируемый супернатант, разведенный в указанных выше соотношениях, аккуратно перемешивали и инкубировали планшет в течение 72 ч для инфицирования клеток и экспрессии вводимых при трансдукции маркерных генов. Спустя 72 ч из всех лунок удаляли среду аспиратором, после чего в каждую лунку вносили по 2 мл фосфатно-солевого буфера, ресуспендировали клетки и с помощью цитометра Cytomics FC 500 определяли эффективность трансдукции, на основании чего рассчитывали титр рекомбинантных лентивирусных частиц.

Лентивирусная трансдукция клеток линий 4-1BBL-mbIL-21 и 4-1BBL-mbIL-15. Клетки линий 4-1BBL-mbIL-21 и 4-1BBL-mbIL-15 вносили в лунки 24-луночного культурального планшета для суспензионных культур (*Sarstedt Group*) в 0,5 мл полной ростовой среды RPMI-1640 (плотность суспензии составляла $1,2 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл). Вирусные частицы, разведенные в полной ростовой среде RPMI-1640, добавляли к клеткам в количестве, необходимом для достижения желаемой множественности инфекции. Далее проводили центрифугирование при температуре 37 °C и ускорении 800 g в течение 90 мин. По окончании спинокуляции клетки культивировали 48 ч.

Сортировка флуоресцентно-активированных клеток. Оценку эффективности генетической модификации проводили методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC 500. Количество трансдуцированных клеток определяли по наличию экспрессии ИЛ-12 на поверхности клеток.

Для получения чистой популяции клеток, экспрессирующих ИЛ-12 и ИЛ-18, клетки полученных генетически модифицированных клеточных линий двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере, затем инкубировали с моноклональными антителами к ИЛ-12 (*Becton, Dickinson and Company*, США) в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки, экспрессирующие ИЛ-12, сортировали на приборе FACSVantage SE (*Becton, Dickinson and Company*).

Иммунофенотипическая характеристика полученных линий. Клетки полученных генетически модифицированных клеточных линий двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере, затем инкубировали с соответствующими специфическими моноклональными антителами в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Использовали моноклональные антитела к ИЛ-12, меченные PE (клон REA121) (*Miltenyi Biotec*, Германия), моноклональные антитела к ИЛ-21, меченные APC (клон 3A3-N2.1) (*Becton, Dickinson and Company*), моноклональные антитела к белку 4-1BBL, меченные PE (клон C65-485) (*Becton, Dickinson and Company*). Экспрессия мембранно-связанной формы ИЛ-18 на поверхности фидерных клеток оценивалась только по уровню экспрессии мРНК. Запись проводили на приборе Cytomics FC 500. Обработку полученных результатов выполняли с использованием программы *CXP Analysis* (*Beckman Coulter*).

Определение экспрессии трансгенов методом количественной ПЦР. Транскрипцию генов рекомбинантных мембранно-связанных форм цитокинов ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21 и гена 4-1BBL человека оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени. Нормализацию проводили по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *GUS*. При выполнении ПЦР использовали пару праймеров для каждого гена (см. таблицу) и готовую реакционную смесь SYBR Green PCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*). Праймеры подбирались с помощью онлайн-сервиса *Primer-BLAST*, синтез осуществлялся на заказ (*Праймтех*, Беларусь). Метод расчета результатов – ΔCt. Материалом для анализа являлась кДНК, выделенная из материала исходной клеточной линии К-562 и ее производных 4-1BBL-mbIL-21_12_18, 4-1BBL-mbIL-15_12_18, полученных в результате лентивирусной трансдукции и обогащения методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток. В качестве контроля контаминации образца кДНК геномной ДНК, содержащей экспрессионную кассету в составе провируса, использовали реакционную смесь для синтеза кДНК без обратной транскриптазы.

Праймеры для проведения ПЦР в реальном времени
Primers for real-time PCR

Ген	Последовательность (5' → 3')
<i>CD8A</i>	F: CCTTACCAGTGACCGCCTTG R: CTCAGCAGCAGAACTCCG
<i>mIL21</i>	F: CCTTACCAGTGACCGCCTTG R: CTACATCTTCTGGAGCTGGCA

Окончание таблицы
Ending table

Ген	Последовательность (5' → 3')
<i>mIL15</i>	F: CCTTACCAGTGACCGCCTTG R: TGCAACTGGGGTGAACATCA
<i>mIL18</i>	F: CCTTACCAGTGACCGCCTTG R: AGAGGCCGATTCCTTGGTC
<i>mIL12</i>	F: CAAGCTGTGCATCCTGCT R: CTCAGCAGCAGAACTCCG
<i>4-1BBL</i>	F: CGCGGATCCGGTCTGAAC R: CCGCTCGAGTTATTATTC
<i>GUS</i>	F: GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA

Выделение РНК осуществляли с помощью набора RNeasy Mini Kit (*Qiagen*, США) в соответствии с протоколом производителя. Синтез кДНК проводили с использованием набора SuperScript III Reverse Transcriptase (*Invitrogen*, США) согласно рекомендации фирмы-изготовителя.

Результаты и их обсуждение

Получение генетически модифицированных фидерных клеточных линий. Для получения новых фидерных клеточных линий была сконструирована бицистронная экспрессионная кассета на базе лентивирусного трансфер-вектора второго поколения pUltra. Карта кассеты представлена на рис. 1.

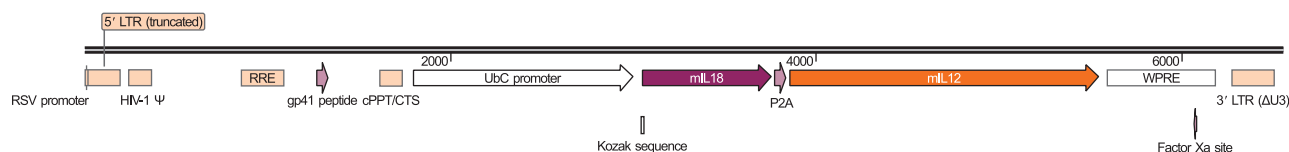


Рис. 1. Карта сконструированной бицистронной экспрессионной кассеты, кодирующей мембранно-связанные формы ИЛ-12 и ИЛ-18

Fig. 1. Map of the constructed bicistronic expression cassette encoding membrane-bound forms of IL-12 and IL-18

Нуклеотидные последовательности, кодирующие мембранно-связанные формы цитокинов человека, были сконструированы путем замены в гене *CD8A* участка, кодирующего внеклеточные домены белка *CD8A*, на последовательность нуклеотидов, которая несет информацию об аминокислотном составе зрелой формы соответствующего цитокина. Благодаря наличию в таком модифицированном гене участков, кодирующих сигнальный пептид и трансмембранный домен белка *CD8A*, белки цитокинов закрепляются на поверхности клетки, что позволяет с помощью соответствующих флуоресцентно-меченых антител обнаружить и отсортировать клетки с выраженной экспрессией вводимого гена на приборе FACS Vantage SE.

Получение генетически модифицированных фидерных клеточных линий с эктопической экспрессией рекомбинантных мембранно-связанных форм ИЛ-12 и ИЛ-18 человека осуществляли методом лентивирусной трансдукции исходных линий 4-1BBL-mbIL-21 и 4-1BBL-mbIL-15.

Экспрессия введенных трансгенов подтверждалась как на уровне мРНК методом количественной ПЦР, так и на уровне белковых продуктов методом проточной цитометрии. На рис. 2 представлена экспрессия вводимых трансгенов на уровне мРНК.

Данные количественной ПЦР подтверждают экспрессию генов рекомбинантных мембранно-связанных форм цитокинов ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-21 и гена *4-1BBL* человека для полученной линии 4-1BBL-mbIL-21_12_18 и экспрессию генов рекомбинантных мембранно-связанных форм цитокинов ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18 и гена *4-1BBL* человека для полученной линии 4-1BBL-mbIL-15_12_18.

На рис. 3 и 4 представлена иммунофенотипическая характеристика полученных фидерных клеточных линий 4-1BBL-mbIL-21_12_18 и 4-1BBL-mbIL-15_12_18 на уровне белковых продуктов мембранно-связанных форм цитокинов ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21 и гена *4-1BBL* человека.

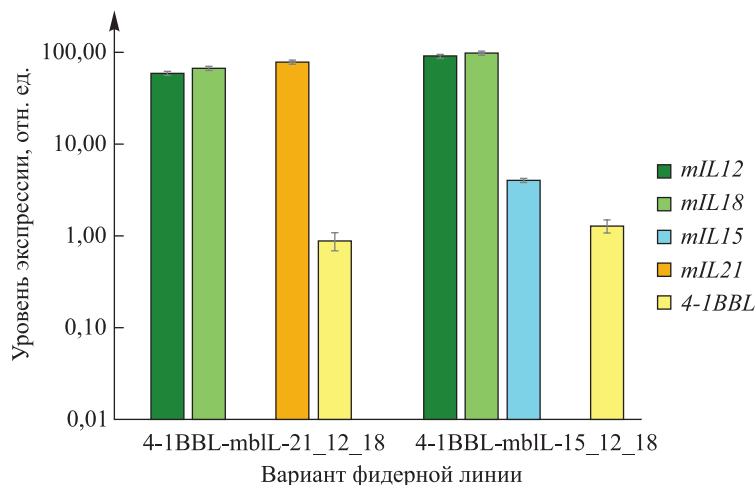


Рис. 2. Экспрессия вводимых трансгенов на уровне мРНК для полученных фидерных линий
 Fig. 2. Expression of the introduced transgenes at the mRNA level for the obtained feeder lines

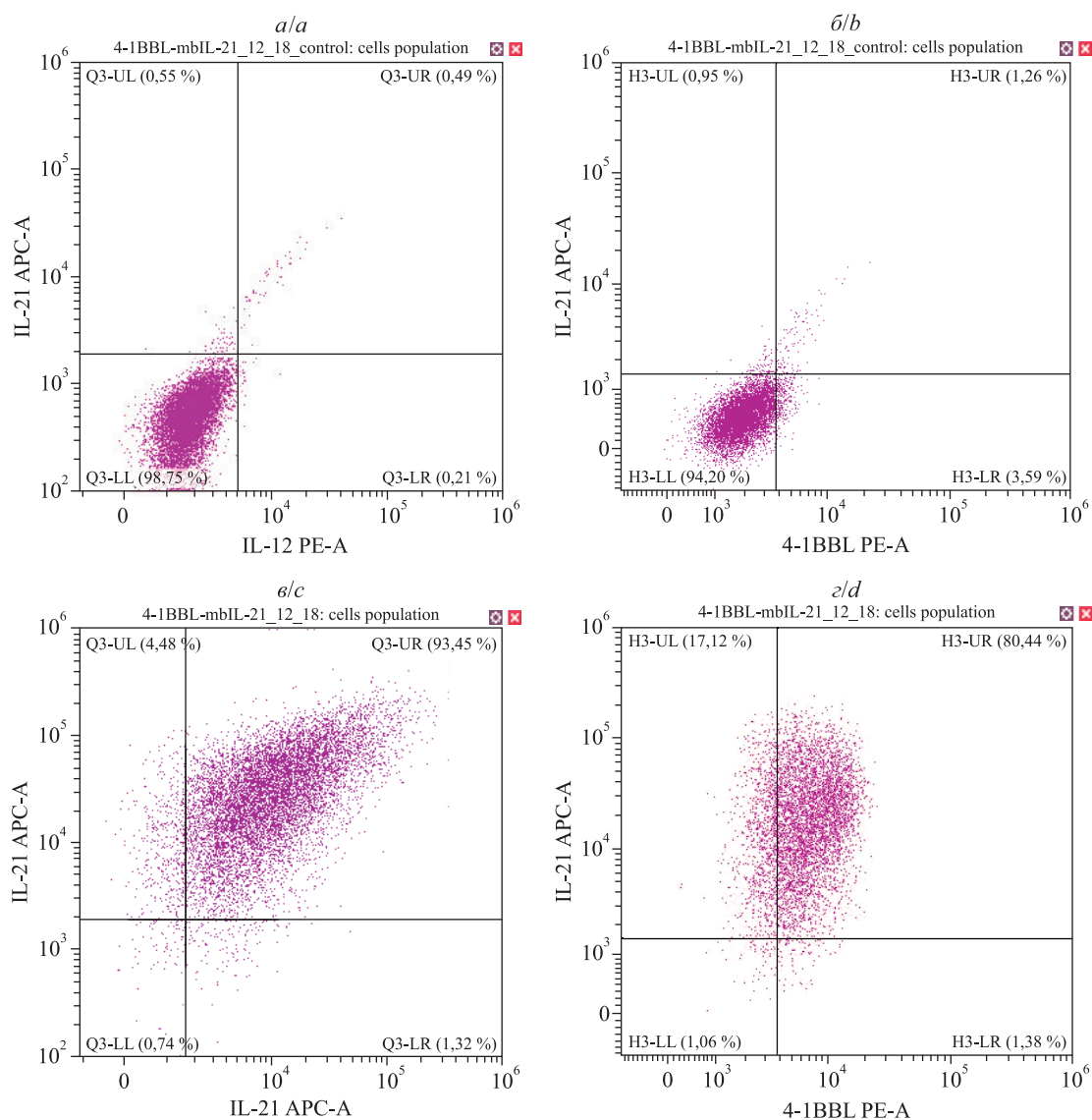


Рис. 3. Экспрессия вводимых трансгенов на уровне белковых продуктов в полученной линии 4-1BBL-mbIL-21_12_18: а, б – без добавления моноклональных антител; в, г – с добавлением моноклональных антител

Fig. 3. Expression of the introduced transgenes at the level of protein products in the resulting line 4-1BBL-mbIL-21_12_18: а, b – without addition of monoclonal antibodies; c, d – with addition of monoclonal antibodies

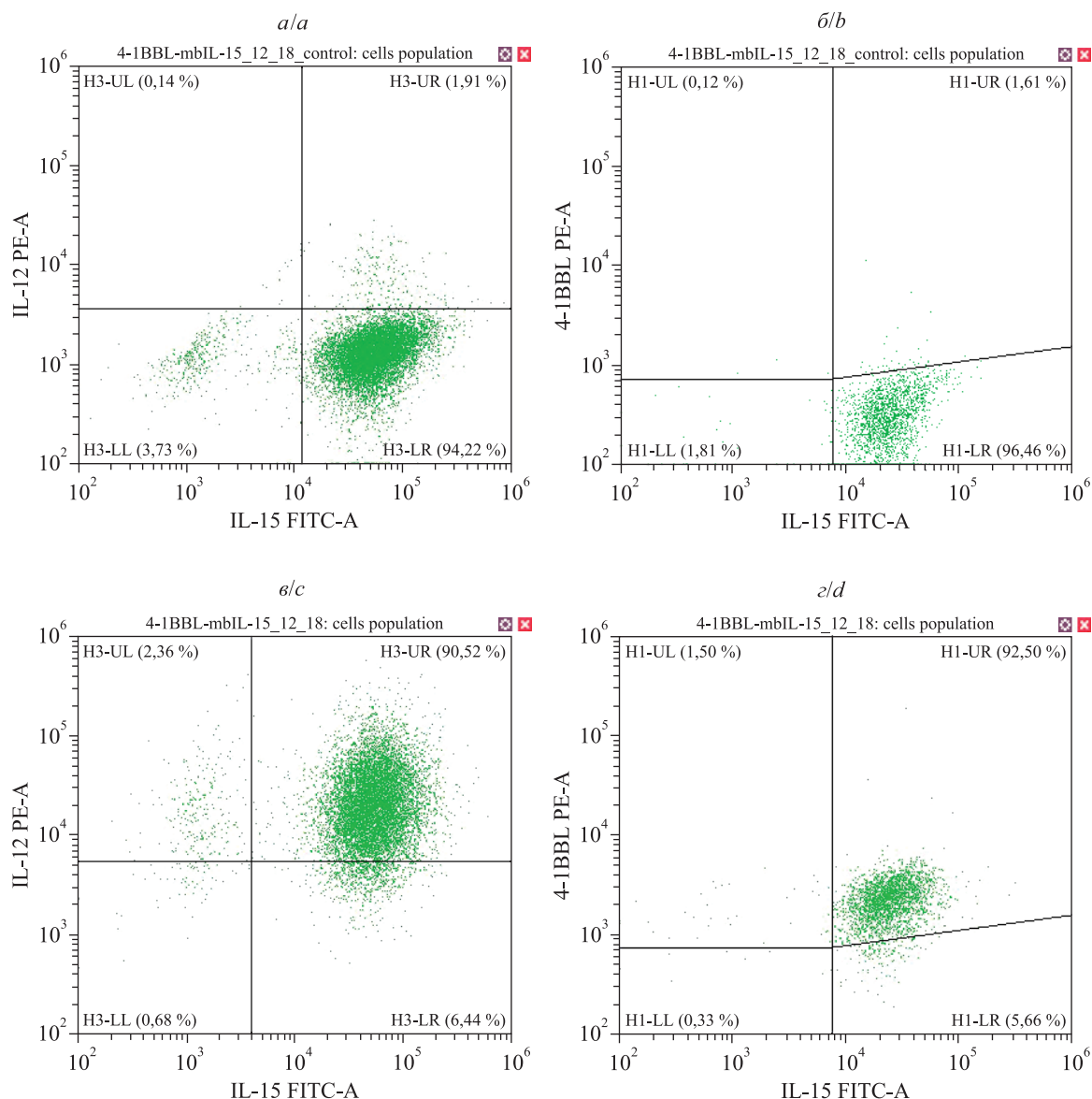


Рис. 4. Экспрессия вводимых трансгенов на уровне белковых продуктов в полученной линии 4-1BBL-mbIL-15_12_18: а, б – без добавления моноклональных антител; в, г – с добавлением моноклональных антител

Fig. 4. Expression of the introduced transgenes at the level of protein products in the resulting line 4-1BBL-mbIL-15_12_18: а, b – without addition of monoclonal antibodies; c, d – with addition of monoclonal antibodies

Анализ данных проточной цитофлуориметрии показал, что клетки линий 4-1BBL-mbIL-21_12_18 и 4-1BBL-mbIL-15_12_18 экспрессируют ген *4-1BBL* человека, а также рекомбинантные мембранно-связанные формы цитокинов ИЛ-12, ИЛ-18 и ИЛ-21 (первая линия) и ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-18 (вторая линия). Эффективность экспрессии гена ИЛ-18 определяли только по уровню экспрессии мРНК. Однако гены ИЛ-12 и ИЛ-18 располагаются в одной экспрессионной кассете, поэтому исходя из наличия экспрессии ИЛ-12 можно сделать вывод и об экспрессии ИЛ-18 в полученных линиях. Таким образом, экспрессия введенных трансгенов подтверждена не только на уровне продуктов мРНК, но и на уровне белковых продуктов на поверхности клеток линий 4-1BBL-mbIL-21_12_18 и 4-1BBL-mbIL-15_12_18.

Заключение

В ходе исследования получены две новые фидерные клеточные линии на основе клеток линии К-562 с эктопической экспрессией комбинаций цитокинов ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-18 и ИЛ-21, ИЛ-12, ИЛ-18, обеспечивающие экспансию ЕК-клеток с усиленной противоопухолевой активностью для целей противоопухолевой терапии [6–9].

Библиографические ссылки

1. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1869. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01869.
2. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2016;65(4):477–484. DOI: 10.1007/s00262-016-1792-y.
3. Вашкевич ЕП, Мигас АА, Мелешко АН, Матвеенко МА, Струшкевич НВ, Шман ТВ. Экспансия и активация естественных киллерных клеток человека *ex vivo* в присутствии трансгенных фидерных клеточных линий. *Цитология*. 2020;62(4):258–265. DOI: 10.31857/S0041377120040070.
4. Pahl JHW, Cerwenka A, Ni J. Memory-like NK cells: remembering a previous activation by cytokines and NK cell receptors. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:2796. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02796.
5. Somanchi SS, Senyukov VV, Denman CJ, Lee DA. Expansion, purification, and functional assessment of human peripheral blood NK cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;48:2540. DOI: 10.3791/2540.
6. Shevtsova A. Evaluation of the effect of cytokines: IL-12, IL-18 and their combinations on the expansion, activation and functional activity of NK-cells. In: *14th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists; 2019 May 17–18; Bialystok, Poland*. Bialystok: [s. n.]; 2019. p. 79.
7. Шевцова АС. Изменение свойств естественных киллерных клеток с помощью генно-модифицированных фидерных клеточных линий для целей противоопухолевой иммунотерапии. В: *Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации. Сборник материалов I Объединенного конгресса НОДГО и РОДО; 23–25 ноября 2020 г.; Москва, Россия*. Москва: Национальное общество детских гематологов и онкологов; 2020. с. 110.
8. Мухаметшина АС, Мигас АА, Матвеенко МА, Шман ТВ. Создание и использование генно-инженерных фидерных клеточных линий для экспансии естественных киллерных клеток с повышенной продукцией ИФН- γ . В: Гончаров АЕ, Скоробогатова АС, Полешко АГ, Мартынова МА, Пинчук СВ, Бушмакина ИМ и др., редакторы. *Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии. Тезисы докладов Международной научной конференции; 20–21 мая 2021 г.; Минск, Беларусь*. Минск: [б. и.]; 2021. с. 36.
9. Mukhametshyna N, Lasiukov Ya, Shman T. Harnessing genetically engineered feeder cell line for *ex vivo* expansion of human natural killer cells with increased production of IFN- γ . In: Juozaitytė E, editor. *7th Kaunas/Lithuania International Hematology/Oncology Colloquium; 2022 May 26; Kaunas, Lithuania*. [S. l.]: [s. n.]; 2022. p. 10–11.

References

1. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1869. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01869.
2. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2016;65(4):477–484. DOI: 10.1007/s00262-016-1792-y.
3. Vashkevich EP, Migas AA, Meleshko AN, Matveyenka MA, Strushkevich NV, Shman TV. Human natural killer cells expansion and activation *ex vivo* in the presence of transgenic feeder cell lines. *Tsitologiya*. 2020;62(4):258–265. Russian. DOI: 10.31857/S0041377120040070.
4. Pahl JHW, Cerwenka A, Ni J. Memory-like NK cells: remembering a previous activation by cytokines and NK cell receptors. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:2796. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02796.
5. Somanchi SS, Senyukov VV, Denman CJ, Lee DA. Expansion, purification, and functional assessment of human peripheral blood NK cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;48:2540. DOI: 10.3791/2540.
6. Shevtsova A. Evaluation of the effect of cytokines: IL-12, IL-18 and their combinations on the expansion, activation and functional activity of NK-cells. In: *14th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists; 2019 May 17–18; Bialystok, Poland*. Bialystok: [s. n.]; 2019. p. 79.
7. Shevtsova AS. [Changing the properties of natural killer cells using genetically modified feeder cell lines for the purposes of antitumor immunotherapy]. In: *Aktual'nye problemy i perspektivy razvitiya detskoj gematologii-onkologii v Rossijskoj Federatsii. Sbornik materialov I Ob'edinennogo kongressa NODGO i RODO; 23–25 noyabrya 2020 g.; Moskva, Rossiya* [Actual problems and prospects for the development of pediatric hematology and oncology in the Russian Federation. Collection of materials of the 1st Joint congress of NODGO and RODO; 2020 November 23–25; Moscow, Russia]. Moscow: National Society of Pediatric Hematologists and Oncologists; 2020. p. 110. Russian.
8. Mukhametshina AS, Migas AA, Matveenko MA, Shman TV. [Creation and use of genetically engineered feeder cell lines for the expansion of natural killer cells with increased production of IFN- γ]. In: Goncharov AE, Skorobogatova AS, Poleshko AG, Martynova MA, Pinchuk SV, Bushmakina IM, et al., editors. *Sovremennye problemy kletочноi inzhenerii, immunologii i allergologii. Tezisy докладov Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii; 20–21 maya 2021 g.; Minsk, Belarus'* [Modern problems of cell engineering, immunology and allergology. Abstracts of the International scientific conference; 2021 May 20–21; Minsk, Belarus]. Minsk: [s. n.]; 2021. p. 36. Russian.
9. Mukhametshyna N, Lasiukov Ya, Shman T. Harnessing genetically engineered feeder cell line for *ex vivo* expansion of human natural killer cells with increased production of IFN- γ . In: Juozaitytė E, editor. *7th Kaunas/Lithuania International Hematology/Oncology Colloquium; 2022 May 26; Kaunas, Lithuania*. [S. l.]: [s. n.]; 2022. p. 10–11.