

УДК 616.155.392 – 018 – 085.277.3 – 053.2

## Противоопухолевая активность цитотоксических клеток периферической крови у детей с острым лимфобластным лейкозом

Е.П. Вашкевич

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии», Минск, Беларусь

## Antitumor activity of peripheral blood cytotoxic cells in childhood acute lymphoblastic leukemia

K.P. Vashkevich

Belarusian research center for pediatric oncology and hematology, Minsk, Belarus

### Аннотация

Одним из направлений в лечении лейкозов является использование естественных киллерных (ЕК) и ЕКТ клеток. Целью нашей работы было изучение противоопухолевой активности таких клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Результаты были получены при использовании метода проточной цитофлуориметрии. В ходе проведенных исследований показано, что интерлейкин (ИЛ)-2 достоверно повышал процент активированных ЕК и ЕКТ клеток пациентов, однако, индукция активации была достоверно ниже по сравнению с таковой у доноров. ИЛ-2 также способствовал увеличению цитотоксической активности (ЦТА) мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) пациентов против линии K-562 и незначительно повышал ЦТА по отношению к собственным опухолевым клеткам. При этом противоопухолевая активность стимулированных ИЛ-2 МНК пациентов против аутологичных лейкозных клеток и линии K-562 была достоверно ниже по сравнению с ЦТА активированных МНК доноров против тех же опухолевых мишеней. Т.о. использование ИЛ-2 повышало активацию и противоопухолевую активность цитотоксических клеток пациентов с ОЛЛ, однако, в меньшей степени, чем доноров.

### Ключевые слова

ЕК клетки, ЕКТ клетки, цитотоксичность, интерлейкин-2, острый лейкоз

Адоптивная иммунотерапия с применением ЕК и ЕКТ клеток является одним из направлений в лечении онкологических заболеваний [1-6]. Преимуществом использования таких клеток является их способность лизировать опухолевые мишени без рестрикции по антигенам

### Summary

One of the directions in the treatment of leukemia is the use of natural killer (NK) and NKT cells. The aim of our work was to study the antitumor activity of these cells in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Results were obtained using the method of flow cytometry. We showed that interleukin (IL)-2 significantly increased activation of patient's NK and NKT cells, however, the induction of activation was significantly lower compared with that of donors. IL-2 also increased cytotoxic activity of patient's peripheral blood mononuclear cells (MNCs) against K-562 cell line and slightly increased cytotoxic activity against autologous tumor cells. At the same time IL-2-stimulated MNCs of patients displayed significantly lower antitumor activity against autologous leukemic cells and K-562 cell line than similar cells of healthy donors. Thus IL-2-dependent activation and antitumor activity was more pronounced for donors' cytotoxic cells rather than for patients'.

### Key words

NK cells, NKT cells, cytotoxicity, interleukin-2, acute leukemia

МНС и отсутствие необходимости в предварительной сенсibilизации [1].

ЕК клетки составляют примерно 5–20 % от лимфоцитов периферической крови человека, фенотипически характеризуются экспрессией поверхностного маркера CD56 и отсутствием

CD3 [7, 8]. ЕКТ клетки – небольшая (до 5%) популяция лимфоцитов периферической крови, несущая на своей поверхности антигены CD3 и CD56 [7, 9, 10]. Получаемые *in vitro* при культивировании со стимулирующими факторами (ИЛ-2, ИФН (интерферон)- $\gamma$  и др.) CD3+CD56+ клетки получили название cytokine-induced killer cells (CIK) [7, 9]. ЕК и ЕКТ/CIK лизируют клетки-мишени посредством высвобождения содержимого цитотоксических гранул и лиганд-рецепторного взаимодействия (FasL-Fas, TRAIL), а также секретируют иммунорегуляторные цитокины (ФНО (фактор некроза опухоли)- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  и др.) [11, 12-16].

В экспериментах *in vitro* и на моделях животных показано, что ЕК и ЕКТ/CIK клетки обладают ЦТА против широкого спектра опухолей [17, 18-23]. Однако, существуют данные о низкой чувствительности лейкозных клеток к противоопухолевому действию аутологичных цитотоксических клеток. Использование различных факторов (ИЛ-2, ИЛ-15, антитела к CD3 и др.) позволяет увеличить ЦТА эффекторов как против аутологичных, так и аллогенных лейкозных мишеней [24-28].

Целью данной работы было – изучить противоопухолевый потенциал цитотоксических клеток периферической крови при остром лимфобластном лейкозе у детей.

### Материалы и методы

Объектом исследования являлись МНК периферической крови, полученные от 42 пациентов с диагнозом ОЛЛ, находящихся в ремиссии после основного лечения, и от 58 здоровых доноров. Медиана возраста пациентов составила 5,5 лет.

МНК выделяли на градиенте плотности Гистопак (Histopaque) (плотность 1,077 г/мл) при 400g 30 минут, дважды отмывали культуральной средой с добавлением 1% эмбриональной телячьей сыворотки (все «Sigma-Aldrich», США).

После выделения МНК культивировали в условиях 5% CO<sub>2</sub>, 95% влажности и 37°C в полной питательной среде IMDM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин («Sigma-Aldrich», США) и гентамицина (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь) в концентрации 1 млн/мл в присутствии ИЛ-2 (1000 МЕ/мл, препарат «Ронколейкин», «Биотех», Россия). На 3-5 сутки определяли жизнеспособность и количество МНК в культуре с использованием красителя трипанового синего под световым микроскопом.

Субпопуляционный состав и активацию клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител (МАТ). Для этого МНК после культивирования двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), осаждая клетки центрифугированием 5 мин. при 300g. Затем клетки инкубировали с МАТ CD3-FITC, CD56-PC-5, CD69-PE и изотипическим контролем («Becton Dickinson», США; «Beckman Coulter», США) в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации с антителами клетки дважды отмывали в ФСБ. Исследования выполняли на проточном лазерном цитофлуориметре FACScan («Becton Dickinson», США). Для каждого образца анализировали не менее 10<sup>4</sup> клеток. Обработка полученных результатов проводилась с использованием статистического пакета цитофлуориметра CellQuestPro.

Противоопухолевую активность МНК также оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием окраски карбоксифлуоресцеиндиацетат-сукцинилмидил эфир (КФСЭ) и пропидиум иодида. В день постановки теста клетки-мишени (эритромиелоидная опухолевая линия К-562 и образцы лейкозных клеток пациентов с содержанием бластов более 90%) отмывали в культуральной среде, довели до концентрации 1\*10<sup>6</sup>/мл и окрашивали КФСЭ, после чего инкубировали при 5% CO<sub>2</sub>, 95% влажности и 37°C в течение 20 минут. Затем клетки отмывали полной питательной средой, ресуспендировали в ней и смешивали с клетками-эффекторами, в качестве которых использовали МНК здоровых доноров и пациентов. Соотношения эффектор:мишень составляли 10:1, 20:1, 40:1. Цитотоксический тест проводили в течение 4-х часов. По окончании реакции в клеточную взвесь добавляли пропидиум иодид. С использованием статистического пакета цитофлуориметра CellQuestPro клетки-мишени выделяли по флуоресценции КФСЭ, а количество погибших клеток определяли по окрашиванию пропидиумом иодидом. Специфический лизис вычисляли по следующей формуле [20]:

$$\frac{\%PI+ \text{клеток}_{\text{опыт}} - \%PI+ \text{клеток}_{\text{спонт.}}}{100\% - \%PI+ \text{клеток}_{\text{спонт.}}} * 100\%, \text{ где}$$

%PI+ клеток<sub>опыт</sub> – процент лизированных клеток в опытных образцах при совместном культивировании мишеней и МНК, %PI+ клеток<sub>спонт.</sub> – спонтанный лизис клеток-мишеней.

Данные, полученные в ходе исследований, обрабатывали путем определения средних значений, ошибки средней. Сравнение вариацион-

ных рядов проводили с применением непараметрических методов в программе Statistica 6.0. Достоверными считали различия при  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследование противоопухолевого иммунитета онкологических пациентов является важным звеном при разработке новых методов иммунотерапии. В своей работе мы исследовали влияние ИЛ-2 на функциональную активность аутологических и аллогенных цитотоксических клеток, полученных из периферической крови пациентов с ОЛЛ и доноров, против опухолевых клеток. ИЛ-2 был выбран исходя из результатов, полученных нами ранее при исследовании функциональной активности МНК доноров, и как препарат, разрешенный для использования в клинической онкологической практике [29, 30]. В нашей работе было показано, что *in vitro* ИЛ-2 и ИЛ-15 и в меньшей степени ИЛ-12 повышали противоопухолевую активность цитотоксических клеток доноров [29]. Сопоставимые результаты были получены другими исследователями. [24, 31].

На первом этапе мы оценили влияние ИЛ-2 на активацию ЕК и ЕКТ клеток пациентов и доноров по экспрессии поверхностного клеточного рецептора CD69. Данный маркер используется для определения активации лимфоцитов, в т.ч. при стимуляции ИЛ-2 [32-36]. На рисунке 1 представлен пример оценки экспрессии рецептора CD69 на ЕК клетках с использованием техники проточной цитофлуориметрии. Область лимфоцитов выделяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния (рис. 1 А), далее среди них выделяли популяцию ЕК клеток по экспрессии CD56 и отсутствию экспрессии CD3 (рис. 1 Б), после чего определяли процент ЕК клеток, экспрессирующих рецептор CD69 (рис. 1 В, Г). В ходе проведенных исследований показано, что ИЛ-2 достоверно ( $P < 0,00001$ ,  $n=29$ ) повышал процент активированных ЕК и ЕКТ клеток пациентов после 3-5-ти суточной инкубации *in vitro*. Процент активированных ЕК и ЕКТ клеток среди МНК, инкубированных с ИЛ-2, составил  $73,2 \pm 4,3$  и  $80,7 \pm 3,1$  соответственно по сравнению с контрольными образцами (без

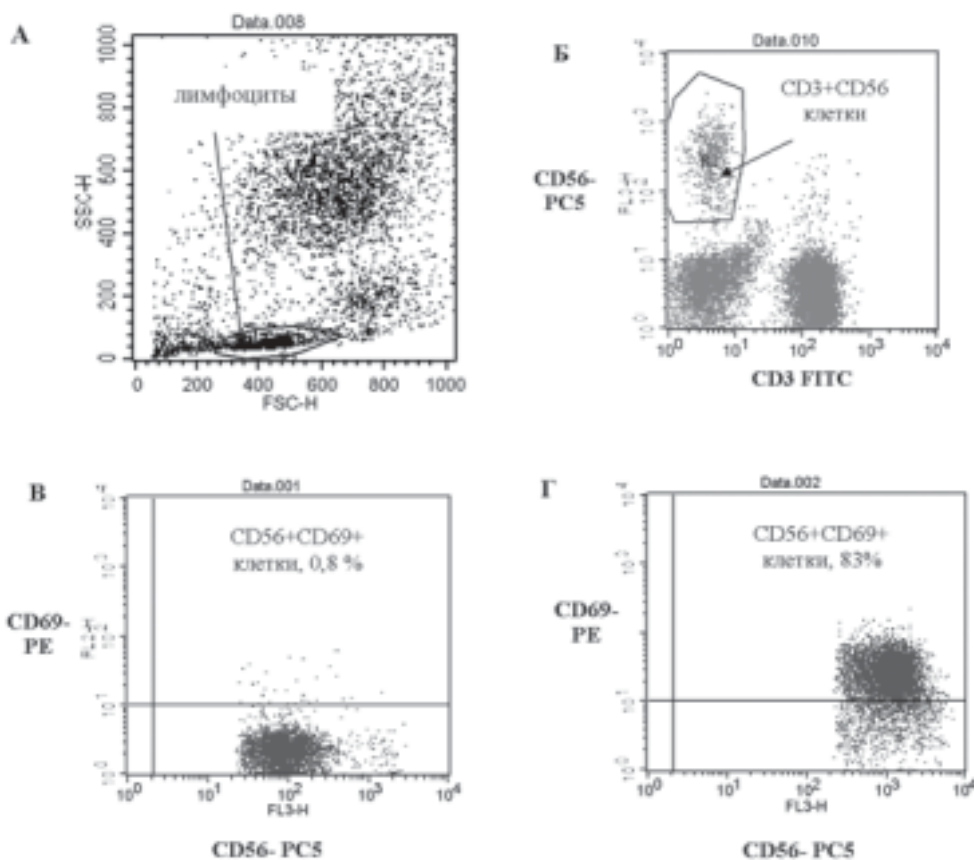


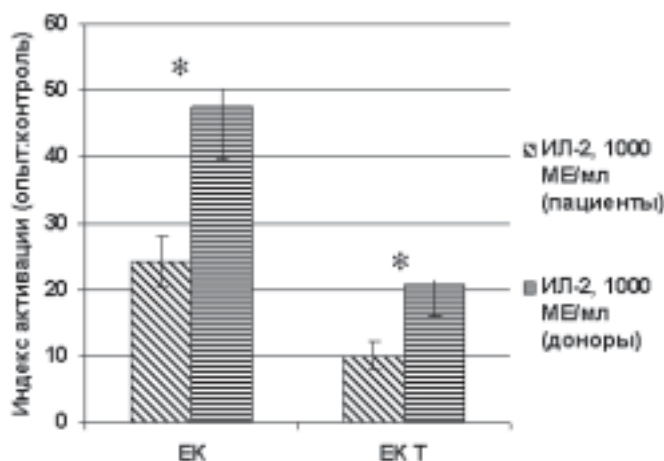
Рис. 1. Пример оценки экспрессии рецептора CD69 на ЕК клетках периферической крови здоровых доноров: А) выделение области лимфоцитов по прямому и боковому светорассеянию, Б) выделение ЕК клеток по наличию CD56 и отсутствию CD3, В) экспрессия CD69 на неактивированных ЕК клетках, Г) экспрессия CD69 на ЕК клетках, инкубированных с ИЛ-2.

ИЛ-2) –  $6,9 \pm 1,3$  и  $18,2 \pm 2,4$ . Однако, у пациентов индукция активации исследуемых популяций клеток под действием ИЛ-2 достоверно ниже, чем у доноров. Так процент активированных ЕК клеток пациентов при стимуляции ИЛ-2 повышался в  $24,2 \pm 3,8$  раза, тогда как у доноров – в  $47,6 \pm 7,9$  ( $P < 0,05$ ); для ЕКТ клеток значения составили  $10,0 \pm 2,2$  и  $20,8 \pm 4,7$  соответственно ( $P < 0,05$ ) (рис. 2).

Способность клеток-эффекторов «прямо» лизировать опухолевые клетки-мишени более полно отражает их функциональное (активное) состояние и может служить критерием для их применения в клинике. Поэтому следующий этап работы посвящен определению противоопухолевой активности МНК пациентов и доноров. Вначале мы оценили действие цитотоксических клеток против ЕК- и ЕКТ/СИК-чувствительной опухолевой линии К-562. Было установ-

лено, что ИЛ-2 достоверно повышал активность МНК как пациентов, так и доноров против линии К-562 при всех используемых соотношениях эффектор:мишень (табл. 1). При этом, ЦТА эффекторных клеток пациентов была значительно ниже по сравнению с активностью донорских МНК, как неактивированных, так и инкубированных с ИЛ-2 ( $P < 0,001$ ). В исследовании Torelli G.F. и соавт. ЦТА пациентов с ОЛЛ по отношению к опухолевым линиям (К-562, Raji) была сравнима с ЦТА доноров [24].

Изучение активности эффекторных клеток с применением клеточной линии К-562 позволяет определить только их потенциальную цитолитическую способность, что не отражает истинной цитотоксичности по отношению к аутологичным, а в случае аллогенной трансплантации и к аллогенным опухолевым клеткам больных с острыми лейкозами. Поэтому



**Рис. 2.** Сравнение влияния ИЛ-2 на активацию ЕК и ЕКТ клеток периферической крови доноров (n=49) и пациентов с ОЛЛ (n=29). Данные представлены в виде индекса активации – отношение процента активированных клеток в стимулированных ИЛ-2 образцах МНК к проценту активированных клеток в контроле. \*  $P < 0,05$ .

**Таблица 1.** Цитотоксическая активность МНК пациентов с ОЛЛ и доноров против линии К-562

Соотношение эффекторов:мишень	Процент лизированных клеток-мишеней					
	Пациенты			Доноры		
	n	Контроль	ИЛ-2, 1000 МЕ/мл	n	Контроль	ИЛ-2, 1000 МЕ/мл
10:1	29	$2,2 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,8^*$	37	$7,0 \pm 1,2$	$28,3 \pm 3,7^{**}$
20:1	33	$4,0 \pm 0,7$	$10,0 \pm 1,5^*$	42	$10,8 \pm 1,5$	$38,1 \pm 3,7^{**}$
40:1	28	$5,3 \pm 0,9$	$13,0 \pm 2,0^*$	37	$17,2 \pm 2,5$	$50,0 \pm 3,9^{**}$

Примечание: \*, \*\* – достоверность различий между ЦТА контрольных образцов МНК и МНК, стимулированных ИЛ-2, пациентов и доноров соответственно. \* –  $P < 0,001$ , \*\* –  $P < 0,00001$ .

для оценки противоопухолевой активности МНК мы также использовали в качестве мишеней лейкозные клетки пациентов с ОЛЛ. В работе Linn Y.C. с соавт. показано, что лимфоидные бластные клетки, в отличие от миелоидных, обладали низкой чувствительностью к аутологичным и аллогенным СИК клеткам [25]. Torelli G.F. и Казанова Г.В. с соавт. показали, что цитотоксичность МНК пациентов с ОЛЛ в период ремиссии резко снижена по отношению к собственным бластам, при этом чувствительность таких бластов была выше к аллогенным цитотоксическим клеткам. Увеличение ЦТА аутологичных и аллогенных эффекторных клеток наблюдалось при активации ИЛ-2 и ИЛ-15 [24, 26]. Проведенные нами исследования выявили, что инкубация МНК пациентов с ИЛ-2 практически не повышала их литическую активность в

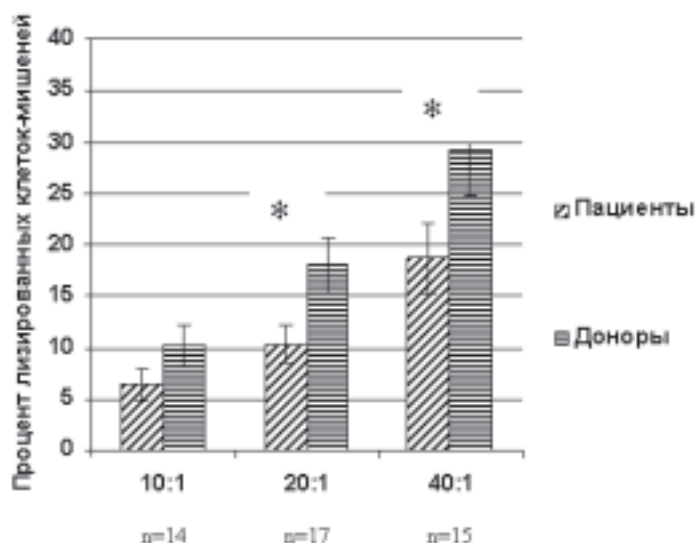
отношении аутологичных (собственных) опухолевых клеток за исключением соотношения эффектор:мишень 40:1 (табл. 2). В то же время противоопухолевая активность МНК доноров против аллогенных опухолевых клеток достоверно усиливалась при действии ИЛ-2 при всех исследуемых соотношениях (табл. 2). При парном сравнении противоопухолевой активности МНК пациентов и доноров в отношении лейкозных клеток этих пациентов было выявлено, что стимулированные ИЛ-2 донорские (аллогенные) цитотоксические клетки более эффективно лизируют лейкозные клетки-мишени (рис. 3).

Низкая чувствительность лейкозных клеток к действию цитотоксических клеток может быть обусловлена как характеристиками самих опухолевых клеток (снижение экспрессии адгезивных молекул, повышение экспрессии МНС I,

**Таблица 2. Цитотоксическая активность МНК пациентов с ОЛЛ и доноров против лейкозных клеток пациентов**

Соотношение эффекторов:мишень	Процент лизированных клеток-мишеней					
	Пациенты			Доноры		
	n	Контроль	ИЛ-2, 1000 МЕ/мл	n	Контроль	ИЛ-2, 1000 МЕ/мл
10:1	16	4,1±1,2	6,0±1,5	20	8,4±1,8	12,9±2,4**
20:1	18	7,8±1,8	9,7±1,8	22	10,2±2,0	19,6±2,6**
40:1	18	13,0±3,1	17,4±3,1*	21	15,9±2,7	29,3±3,9**

Примечание: \*, \*\* – достоверность различий между ЦТА контрольных образцов МНК и МНК, стимулированных ИЛ-2, пациентов и доноров соответственно. \* - P < 0,05, \*\* - P < 0,01.



**Рис. 3. Сравнение противоопухолевой активности активированных МНК доноров и пациентов с ОЛЛ в отношении лейкозных клеток пациентов. \* P < 0,05. Представлены парные случаи.**

экспрессия FasL, секреция ингибирующих факторов, изменение экспрессии лигандов активирующих рецепторов и др.), так и особенностями эффекторов (низкое количество, изменение экспрессии активирующих/ингибиторных рецепторов и др.) [8, 13, 37-40]. Поэтому мы проанализировали связь между содержанием ЕК и ЕКТ клеток и ЦТА и сравнили чувствительность опухолевых клеток пациентов и линии К-562 к активированным эффекторам. Так, для пациентов процент ЕК клеток в образцах МНК, активированных ИЛ-2, составил  $3,2 \pm 0,3$  ( $n=32$ ), тогда как для доноров он был равен  $12,8 \pm 1,0$  ( $n=50$ ) ( $P < 0,0001$ ). Содержание ЕКТ клеток в активированных образцах МНК пациентов и доноров не отличалось. При этом наблюдалась корреляция между содержанием ЕК клеток, но не ЕКТ, и ЦТА к К-562 при всех исследуемых соотношениях эффектор:мишень для активированных ИЛ-2 МНК доноров ( $P < 0,05$ ;  $R=0,42, 0,42, 0,39$ , для соотношений эффектор:мишень 10:1, 20:1, 40:1 соответственно,  $n=31$ ).

Для пациентов такая зависимость была выявлена при соотношении эффектор:мишень 40:1 также для активированных образцов МНК ( $P < 0,05$ ;  $R=0,55$   $n=25$ ). Лизис линии К-562 был также пропорционален содержанию ЕК клеток и в исследовании Linn Y.C. и соавт., а уровень активности данных эффекторов влиял на развитие злокачественных заболеваний [9, 40]. Т.о. низкие значения ЦТА стимулированных образцов МНК пациентов могут быть связаны со сниженным содержанием ЕК клеток в них. При сравнении в парных тестах чувствительности клеток линии К-562, стандартной для определения ЕК- и ЕКТ-активности, и лейкозных клеток пациентов к действию цитотоксических клеток выявили, что лейкозные клетки пациентов менее чувствительны к эффекторному действию стимулированных ИЛ-2 МНК доноров по сравнению с К-562 ( $P < 0,05$ ) (рис. 4 А). Отличий в чувствительности исследуемых опухолевых клеток к действию МНК пациентов не наблюдалось (рис. 4 Б).

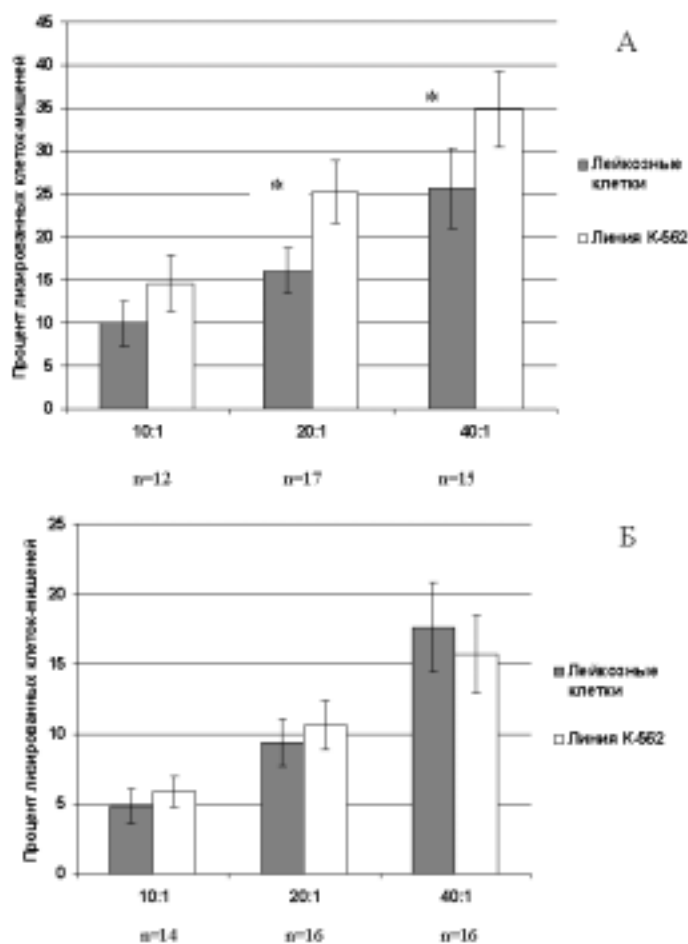


Рис. 4. Сравнение чувствительности лейкозных клеток пациентов и линии К-562 к цитотоксическому действию активированных МНК доноров (А) и пациентов (Б). \*  $P < 0,05$ . Представлены парные случаи.

Таким образом, нами показано, что использование ИЛ-2 повышало активацию ЕК и ЕКТ клеток пациентов с ОЛЛ, однако, в меньшей степени, чем доноров. Активированные ИЛ-2 цитотоксические клетки пациентов с ОЛЛ обладали сниженной противоопухолевой активностью по сравнению с цитотоксическими клетками доноров. Чувствительность лейкозных клеток пациентов по сравнению со стан-

дартной линией К-562 снижена к противоопухолевому действию цитотоксических клеток доноров. Выявленное отсутствие различий в чувствительности лейкозных клеток и К-562 к действию активированных ИЛ-2 МНК пациентов, а также невысокие значения ЦТА таких МНК, указывают на сниженную противоопухолевую активность цитотоксических клеток детей больных ОЛЛ.

## Литература

1. Koehl U., Sørensen J., Esser R. et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2004; 33: 261-66.
2. Jiang H., Liu K.Y., Tong C.R. et al. The efficacy of chemotherapy in combination with auto-cytokine-induced killer cells in acute leukemia. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2005; 44: 198-201.
3. Leemhuis T., Wells S., Scheffold C. et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2005; 11 (3): 181-7.
4. Arai S., Meagher R., Swearingen M. et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*. 2008; 10 (6): 625-32.
5. Klingemann H.-G., Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*. 2004; 6: 15-22.
6. Shi M., Zhang B., Tang Z.-R. et al. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol*. 2004;10 (8): 1146-51.
7. Robertson M.J., Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990; 76 (12): 2421-38.
8. Cho D., Campana D. Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy. *Korean J. Lab. Med*. 2009; 29: 89-96.
9. Schmidt-Wolf I.G.H. et al. Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers. *Br. J. Haematol*. 1994; 87: 453-8.
10. Linn Y.C., Hui K.M. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 2003; 44: 1457-62.
11. Caligiuri M.A. Human natural killer cells. *Blood*. 2008; 112 (3): 461-9.
12. Berg M., Lundqvist A., McCoy J.R.P. et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009; 11 (3): 341-55.
13. Chavez-Galan L., Arenas-Del A.M.C., Zenteno E. et al. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular and Molecular Immunology*. 2009; 6 (1): 15-25.
14. Mendes R., Bromelow K.V., Westby M. et al. Flow cytometric visualization of cytokine production by CD3-CD56+ NK cells and CD3+CD56+ NK-T cells in whole blood. *Cytometry*. 2000; 39: 72-8.
15. Mehta B.A., Schmidt-Wolf I.G.H., Weissman I.L., Negrin R.S. Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced CD3+CD56+ killer cells. *Blood*. 1995; 86 (9): 3493-9.
16. Linn Y.C., Lau S.K.J., Liu B.H. et al. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell. *Immunology*. 2008; 126: 423-35.
17. Lefterova P., Mdrten A., Buttgerit P. et al. Targeting of natural killer-like T immunologic effector cells against leukemia and lymphoma cells by reverse antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Immunother*. 2000; 23 (3): 304-10.
18. Rossi A.R., Pericle F., Rashleigh S. et al. Lysis of neuroblastoma cell lines by human natural killer cells activated by interleukin-2 and interleukin-12. *Blood*. 1994; 83: 1323-8.
19. Hongeng S., Petvises S., Worapongpaiboon S. et al. Generation of CD3+CD56+ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells. *Int. J. Hematol*. 2003; 77 (2): 175-9.
20. Kornacker M., Moldenhauer G., Herbst M. et al. Cytokine-induced killer cells against autologous CLL: direct cytotoxic effects and induction of immune accessory molecules by interferon- $\gamma$ . *Int. J. Cancer*. 2006; 119: 1377-82.
21. Carlsten M., Malmberg K.-J., Ljunggren H.-G. Natural killer cell-mediated lysis of freshly isolated human tumor cells. *Int. J. Cancer*. 2009; 124: 757-62.
22. Kim H.M. et al. Antitumor activity of cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model. *Arch. Pharm. Res*. 2009; 32 (5): 781-7.
23. Siegler U., Kalberer C.P., Nowbakht P. et al. Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia*. 2005; 19: 2215-22.
24. Torelli G.F., Guarini A., Maggio R. et al. Expansion of cytotoxic effectors with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukaemia patients in complete haematologic remission. *Haematologica*. 2005; 90: 785-92.
25. Linn Y.C., Lau L.C. Hui K.M. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts. *Br. J. of Haematol*. 2002; 116: 78-86.
26. Казанова Г.В., Добренёв К.В., Варфоломеева С.Р. и соавт. Цитотоксическая активность мононуклеарных клеток крови и лимфокиноактивированных киллеров у детей с острым лимфобластным лейкозом. *Иммунология*. 2000; 3: 45-7.
27. Torelli G.F., Guarini A., Palmieri G. et al. Expansion of cytotoxic effectors with lytic activity against autologous blasts

- from acute myeloid leukaemia patients in complete haematological remission. *Br. J. Haematol.* 2002; 116: 299-307.
28. Lefterova P., Schakowski F., Buttgereit P. et al. Expansion of CD3+CD56+ cytotoxic cells from patients with chronic lymphocytic leukemia: in vitro efficacy. *Haematologica.* 2000; 85 (10): 1108-9.
29. Вашкевич Е.П., Шман Т.В., Савицкий В.П., Белевцев М.В. Изучение действия интерлейкинов-2, -12 и -15 на пролиферацию и противоопухолевую активность цитотоксических клеток in vitro. Прил. к журн. «Весті Нацыянальнай акадэміі навук». Ч. 4. Серія біялогічных навук; серія медыцынскіх навук. М., Беларус. Навука. 2010; 321-6.
30. Молчанов О.Е., Попова И.А., Козлов В.К., Карелин М.И. Современные тенденции иммунотерапии злокачественных опухолей. С.Пб., Изд-во С.-Пб. ун-та. 2001; 88 с.
31. Varker K.A., Terrell C.E., Welt M. et al. Impaired natural killer cell lysis in breast cancer patients with high levels of psychological stress is associated with altered expression of killer immunoglobulin-like receptors. *J. of Surgical Res.* 2007; 139: 36-44.
32. Simms P.E., Ellis T.M. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1996; 3 (3): 301-4.
33. Lindsey W.B., Lowdell M.W., Marti G.E. et al. CD69 expression as an index of T-cell function: assay standardization, validation and use in monitoring immune recovery. *Cytotherapy.* 2007; 9 (2): 123-32.
34. Condiotti R., Zakai Y.B., Barak V., Nagler A. Ex vivo expansion of CD56+ cytotoxic cells from human umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 2001; 29: 104-13.
35. Koehl U., Esser R., Zimmermann S. et al. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin. Pdiatr.* 2005; 217: 345-50.
36. Huenecke S., Zimmermann S.Y., Kloess S. et al. IL-2-driven regulation of NK cell receptors with regard to the distribution of CD16+ and CD16- subpopulations and in vivo influence after haploidentical NK cell infusion. *J. Immunother.* 2010; 33 (2): 200-10.
37. Rey J., Veuillen C., Vey N. et al. Natural killer and гд T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends in Molecular Medicine.* 2009; 15 (6): 275-84.
38. Mitra R., Singh S., Khar A. Antitumour immune responses. *Expert Rev. Mol. Med.* 2003; 5: 1-19.
39. Farag S.S., Fehniger T.A., Ruggeri L. et al. Natural killer receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood.* 2002; 100 (6): 1935-47.
40. Brittenden J., Heys S.D., Ross J., Eremin O. Natural killer cells and cancer. *Cancer.* 1996; 77 (7): 1226-43.

#### *Сведения об авторах:*

Вашкевич Екатерина Петровна, научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований научного отдела  
 ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии»  
 223040 Республика Беларусь, Минский район, пос. Лесной  
 Телефон (017) 265 40 68. Тел/Факс (017) 265 42 22.  
 Моб. тел. Velcom 029 – 677 21 78  
 E-mail: katsiaryna.vashkevich@gmail.com

Поступила 20.11.10 г.