

Ласюков Е.А., Вашкевич Е.П., Мухаметшина А.С., Новикова М.А., Липай Н.В., Шман Т.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Lasiukov Ya., Vashkevich K., Mukhametshyna N., Novikova M., Lipaj N., Shman T.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Сравнительный анализ методов криоконсервации экспансированных ex vivo естественных киллерных клеток: рекомендации по оптимизации технологий исследования

Comparative Analysis of Cryopreservation Methods
for Expanded Ex Vivo Natural Killer Cells:
Recommendations for Optimizing Research Technologies

Резюме

Цель. На основании сравнительного анализа известных технологий криоконсервации экспансированных ex vivo естественных киллерных клеток рекомендовать к использованию наиболее эффективные в отношении сохранения жизнеспособности ЕК-клеток.

Материалы и методы. В исследование было включено 10 образцов экспансированных ex vivo ЕК-клеток человека, замороженных в 4 типах криопротекторных смесей с использованием различных технологий заморозки и хранившихся в течение 30 суток в парах жидкого азота. Сохранность образцов после размораживания оценивали по показателям жизнеспособности, цитотоксической активности (ЦТА) и фенотипическому профилю клеток.

Результаты. Среди исследованных нами криопротекторных смесей наилучшие показатели сохранения жизнеспособности и цитотоксической активности экспансированных ex vivo ЕК-клеток после криохранения были получены для двух вариантов смесей, в одной из которых ключевыми компонентами явились эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) (25%) и диметилсульфоксид (ДМСО) (10%), а во второй – декстран и ДМСО (5%).

Заключение. Среди исследованных криопротекторных смесей наилучшие показатели сохранения жизнеспособности и цитотоксической активности экспансированных ex vivo ЕК-клеток после криохранения были получены для двух вариантов смесей: ключевыми компонентами одной из них являются ЭТС (25%) и ДМСО (10%); компонентами другой – декстран и ДМСО (5%).

Ключевые слова: ЕК-клетки, экспансия, криоконсервация, иммунотерапия, цитотоксичность, K562-GFP.

Abstract

Purpose. On the basis of a comparative analysis of known cryopreservation technologies for expanded ex vivo natural killer cells, to recommend for use the most effective NK cells in terms of preserving the viability.

Materials and methods. The study included 10 samples of expanded ex vivo human EK cells, frozen in 4 types of cryoprotective mixtures using various freezing techniques and stored for 30 days in liquid nitrogen vapor. The safety of the samples after thawing was assessed in terms of viability, cytotoxic activity, and phenotypic cell profile.

Results. Among the cryoprotective mixtures studied by us, the best results of preserving the viability and cytotoxic activity of expanded ex vivo NK cells after cryostorage were obtained for two variants of mixtures: the key components of the first mixture are FBS (25%) and DMSO (10%); the second components are dextran and DMSO (5%).

Conclusion. Among the studied cryoprotectant, the best results of viability and cytotoxic activity of expanded ex vivo EK cells after cryostorage were obtained for two variants of agents: the key components of one of them are ETS (25%) and DMSO (10%); the other components are dextran and DMSO (5%).

Keywords: NK cells, expansion, cryopreservation, immunotherapy.

■ ВВЕДЕНИЕ

ЕК-клетки представляют собой субпопуляцию цитотоксических клеток, которая составляет примерно 5–20% от всего количества лимфоцитов периферической крови человека и играет важную роль в устранении вирусинфицированных и малигнизированных клеток. ЕК-клетки способны обеспечивать быстрый иммунный ответ без дополнительной активации или сенсibilизации.

Терапия ЕК-клетками рассматривается как перспективный метод лечения ряда форм злокачественных новообразований. Установлена высокая противоопухолевая активность адоптивных аллогенных ЕК-клеток у пациентов с острым миелоидным лейкозом [1]. Клиническое применение ЕК-клеток требует строгой оценки качества получаемых продуктов, определяемой такими показателями, как стерильность образца, чистота полученной популяции, функциональная эффективность. Использование криоконсервированных ЕК-клеток имеет ряд преимуществ по сравнению со свежеполученными клетками: возможность проведения многократных инфузий клеток, полученных в одной серии; однородное качество клеточного продукта для всех доз и др.

Для осуществления криоконсервации при сверхнизких температурах применяются криопротекторы двух типов. К первому типу относятся глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), которые легко проходят через клеточную мембрану и обеспечивают как внутриклеточную, так и внеклеточную защиту клеток от замораживания. Ко второму типу относятся такие вещества, как сахароза, маннит, сорбит, декстран, полиглицоль и т. д., которые обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны [2]. К настоящему времени протекторы первого типа получили более широкое распространение и стандартно используются для замораживания гемопоэтических клеток.

Следует полагать, что результаты опубликованных исследований о влиянии криоконсервации на цитотоксичность ЕК-клеток, экспансированных ex vivo, неоднозначны: от констатации отсутствия значимых эффектов до более чем двукратного снижения цитотоксичности клеток [3–5]. Стоит отметить, что в большинстве работ использовалась стандартная смесь для замораживания, включающая альбумин и ДМСО в качестве криопротектора. Рядом исследований показано, что уменьшение процентного содержания ДМСО или его полная замена на другие криоконсерванты (декстран и др.) приводят к повышению жизнеспособности клеток и сохранению их активности [5].

Установление оптимальных условий криохранения экспансированных ЕК-клеток поможет улучшить противоопухолевую активность и, как следствие, эффективность иммунотерапии.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании сравнительного анализа известных технологий криоконсервации экспансированных ex vivo естественных киллерных клеток рекомендовать к использованию наиболее эффективные в отношении сохранения жизнеспособности ЕК-клеток.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для экспансии ЕК-клеток использовались мононуклеарные клетки периферической крови доноров (n=10), полученные методом градиентного центрифугирования. Для стимуляции экспансии в полную культуральную среду добавляли интерлейкин-2 (ИЛ-2) (50 МЕ/мл) и облученные при 100 Гр фидерные клетки – генетически модифицированные клетки линии К-562, экспрессирующие рекомбинантные белки человека 4-1BBL и мембраносвязанный вариант ИЛ-21 [7]. Продолжительность экспансии составляла 14–21 сутки.

По окончании периода экспансии ЕК-клетки замораживали с использованием 4 видов криоконсервирующих смесей.

Таблица 1
Виды криоконсервирующих смесей

Table 1
Types of cryopreservation mixtures

Условное название криоконсервирующей смеси	Состав криоконсервирующей смеси
25Этс_10дмсо	RPMI 1640 – 65% ЭТС – 25% ДМСО – 10%
2алб_10дмсо	NaCl 0,9% – 50% 40% p-p ЧСА* – 5% ДМСО – 10%
40Этс_10дмсо	Квинтасоль – 50% ЭТС – 40% ДМСО – 10%
декст_5дмсо	Реополиглукин – 50% 20% p-p ЧСА – 45% ДМСО – 5%

Примечание: * человеческий сывороточный альбумин.

Замораживание клеток проводилось двумя методами: в ручном режиме снижения температуры и с использованием программируемого криозамораживателя IceCube 14S (SyLab, Austria). Клетки хранились в криохранилище при температуре -180°C .

Оценка жизнеспособности клеток проводилась с использованием красителя трипанового синего с последующим подсчетом в световом микроскопе.

Субпопуляционный состав и уровень активации клеток определялись методом проточной цитометрии с использованием меченных флуорохромом моноклональных антител CD3-FITC, NKp44-PE, CD56-PE-Cy5, CD69-PE-Cy7 (Beckman Coulter, США).

Для оценки функционального состояния клеток до и после размораживания проводился цитотоксический тест. В качестве клеток-мишеней использовалась иммортализованная культура клеток K-562, трансдуцированная геном флуоресцентного белка GFP. Соотношение эффектор : мишень составляло 1 : 1, 5 : 1 и 10 : 1. Продолжительность совместной инкубации клеток – 1 час. В качестве витального красителя использовался зонд 7-AAD. Клетки-мишени выделялись по флуоресценции GFP, а количество погибших клеток определяли по окрашиванию 7-AAD. Анализ проводился на проточном цитофлуориметре DxFlex Flow Cytometer (Beckman Coulter, США). Цитотоксическая активность ЕК-клеток выражалась как «% специфичный лизис» и рассчитывалась по формуле:

$$\% \text{ Специфичный лизис} = \frac{100 \times (\% \text{ Общий лизис} - \% \text{ Спонтанный лизис})}{100 - \% \text{ Спонтанный лизис}},$$

где «% общий лизис» – процент всех мертвых мишеней в лунке с клетками-эффекторами, «% спонтанный лизис» – процент всех мертвых мишеней в лунке без клеток-эффекторов.

Статистический анализ проводился в программе Statistica 12. Вид распределения полученных данных определяли с использованием критериев Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Поскольку полученные данные не подчиняются закону нормального распределения, для описания групп использовались медиана и 25, 75 процентиля. Достоверность отличий двух выборок определяли по критерию Манна – Уитни.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование проведено с целью сопоставления осуществляемых по предусмотренным различным протоколам технологий криоконсервации, обеспечивающих сохранение жизнеспособности и цитотоксической активности экспансированных *ex vivo* ЕК-клеток. Для этого было протестировано 4 вида смесей. На рис. 1 представлены результаты оценки цитотоксической активности ЕК-клеток до замораживания и после размораживания при использовании различных криоконсервирующих смесей.

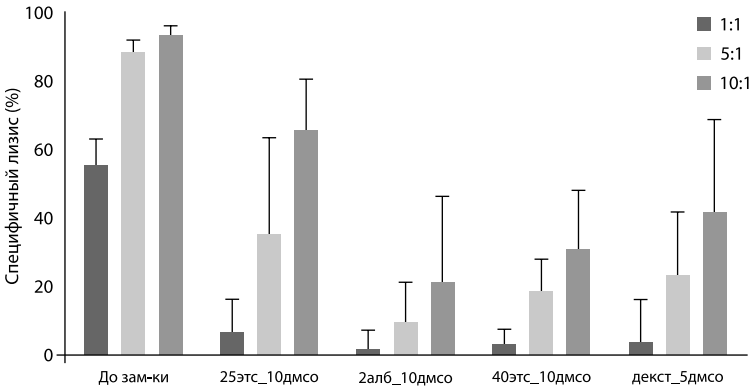


Рис. 1. Цитотоксическая активность экспансированных ЕК-клеток до заморозки и после разморозки

Fig. 1. Cytotoxic activity of expanded NK cells before freezing and after thawing

Как видно из рис. 1, у экспансированных ЕК-клеток после разморозки значительное снижение цитотоксической активности отмечается при использовании всех типов исследуемых смесей. Наибольшая цитотоксическая активность наблюдалась в образцах, хранившихся в смесях 25этс_10дмсо и декст_5дмсо.

Одна из выдвинутых нами гипотез состояла в том, что функциональная активность ЕК-клеток после размораживания способна постепенно восстанавливаться с течением времени. Для ее проверки цитотоксический тест проводился сразу после разморозки, через 1 и 24 часа после инкубации в полной питательной среде. Результаты представлены на рис. 2.

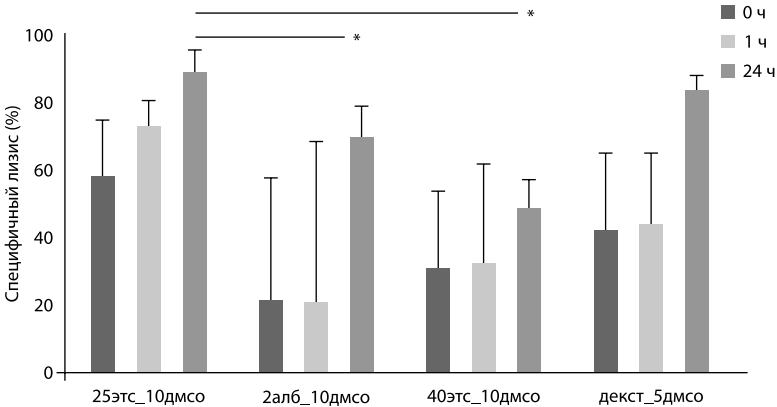


Рис. 2. Цитотоксическая активность экспансированных ЕК-клеток через различное время после разморозки; представлено соотношение эффектор : мишень 10 : 1

Fig. 2. Cytotoxic activity of expanded NK-cells at different times after thawing; attacker-to-target ratio 10 : 1 is represented

Примечание: * p<0,05.

Note: * p<0.05.

Как оказалось, между образцами, проанализированными сразу после размораживания и через 1 час после инкубации, отсутствуют статистически значимые различия по уровню ЦТА. Образцы, протестированные через 24 часа после разморозки, проявляли более высокую цитотоксичность по сравнению с образцами, проанализированными сразу и через 1 час после размораживания, однако не достигают значений ЦТА, наблюдаемых до замораживания. Самые высокие показатели ЦТА выявлены для размороженных ЕК-клеток, которые хранились в смесях 25этс_10дмсо и декст_5дмсо.

Несмотря на то, что после 24 ч инкубации показатели цитотоксического теста увеличивались, значения жизнеспособности клеток снижались примерно в 2 раза (рис. 3). Подобный эффект может быть обусловлен повышенной чувствительностью активированных ЕК-клеток, в частности субпопуляции CD56^{high}CD16⁺, к отсутствию стимуляции [8]. Поиск способов предотвращения апоптоза активированных ЕК-клеток остается открытой задачей.

Ранее показана эффективность высокомолекулярного декстрана в сохранении количества и жизнеспособности периферических стволовых клеток [9]. В выполненном нами исследовании использован реополигликнин, который содержит декстран меньшей массы (30–40 кДа). Полученные данные позволили предположить, что использование более высокомолекулярного декстрана способно улучшить показатели выживаемости и цитотоксичности ЕК-клеток после разморозки. Кроме того, в данной работе не были рассмотрены другие потенциально перспективные внеклеточные криоконсерванты, что требует дополнительных исследований.

Кроме того, нами проведено сравнение жизнеспособности образцов ЕК-клеток, замороженных с применением ручной методики понижения температуры и методики с использованием программного замораживателя (табл. 2). Образцы замороженного с использованием метода аппаратной заморозки биологического материала демонстрируют статистически значимо более высокие показатели жизнеспособности.

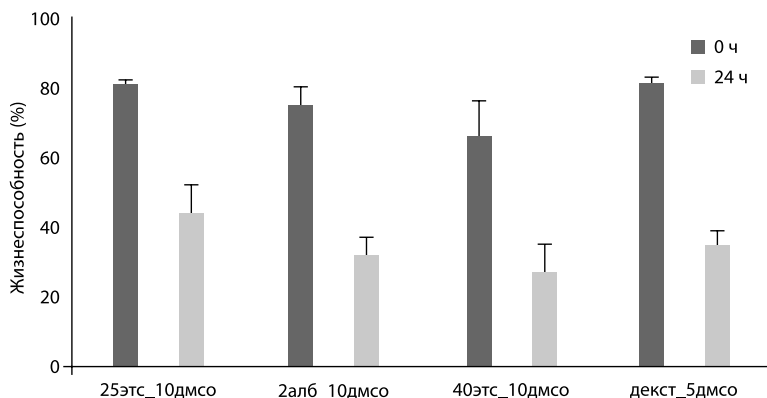


Рис. 3. Жизнеспособность экспандированных ЕК-клеток сразу и через 24 часа после размораживания

Fig. 3. Viability of expanded NK cells at 0h and 24h after thawing

Таблица 2
Цитотоксическая активность экспансированных ЕК-клеток, замороженных программным и ручным способами

Table 2
Cytotoxic activity of expanded NK cells frozen by programmed and manual methods

	Жизнеспособность, %	
	Ручная заморозка	Программная заморозка
25Этс_10дмсо	65,8 (48,1–78)	79,5 (73,4–81,2)*
2алб_10дмсо	26 (16,8–33,3)	73,1 (61,8–80,5)*
40Этс_10дмсо	37,2 (28,8–49,2)	55,8 (49,6–60,5)*
декст_5дмсо	41,7 (28,6–54)	76,8 (65,2–83)*

Примечание: * p<0,05.

Таким образом, для криоконсервирования экспансированных ЕК-клеток целесообразнее использовать программный замораживатель.

В выполненном исследовании не было обнаружено статистически значимых изменений в субпопуляционном составе ЕК-продукта вследствие заморозки (данные не представлены).

■ **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Среди исследованных криопротекторных смесей наилучшие показатели сохранения жизнеспособности и цитотоксической активности экспансированных ex vivo ЕК-клеток после криохранения были получены для двух вариантов смесей: ключевыми компонентами одной из них являются ЭТС (25%) и ДМСО (10%); компонентами другой – декстран и ДМСО (5%).

Дополнительная инкубация размороженных ЕК-клеток в течение 24 часов в полной питательной среде повышает их цитотоксическую активность, но не восстанавливает до уровня значений ЦТА до заморозки. Несмотря на отмеченное повышение ЦТА ЕК-клеток, наблюдается снижение их жизнеспособности независимо от типа использованной криопротекторной смеси.

Программная заморозка значительно улучшает показатели жизнеспособности ЕК-клеток после разморозки.

Вклад авторов: Ласюков Е.А. – техническое выполнение экспериментов, анализ экспериментальных результатов, их изложение, обсуждение и выводы, общее редактирование; Вашкевич Е.П. – культивирование ЕК-клеток, редактирование текста; Мухаметшина А.С. – техническое выполнение экспериментов, статистическая обработка; Новикова М.А. – криоконсервация ЕК-клеток; Липай Н.В. – анализ и обобщение данных лабораторных исследований, подготовка макета статьи; Шман Т.В. – концепция и дизайн исследования, редактирование текста.

Authors’ contribution: Lasyukov E. – technical execution of experiments, analysis of experimental results, their presentation, discussion and conclusions, general editing; Vashkevich E. – culturing of EK cells, text editing; Mukhametshina A. – technical execution of experiments, statistical processing; Novikova M. – cryopreservation of NK cells; Lipai N. – analysis

and generalization of laboratory research data, preparation of the article layout; Shman T. – concept and design of the study, text editing.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Myers J.A., Miller J.S. (2021) Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 18, 85–100. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0426-7>
2. Pohilenko V.D. (2009) Methods of long-term storage of collection crops of microorganisms and development trends. News of higher educational institutions. Volga region. *Medical sciences*, № 4 (12), pp. 99–121.
3. Mark C., Czerwinski T., Roessner S. et al. (2020) Cryopreservation impairs 3-D migration and cytotoxicity of natural killer cells. *Nat Commun.*, 11, 5224.
4. Bachanova V., Miller J.S. (2014) NK Cells in Therapy of Cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 19 (1–2), 133–141. DOI: 10.1615/CritRevOncog.2014011091
5. Mata M.M., Mahmood F., Sowell R.T., Baum L.L. (2014) Effects of cryopreservation on effector cells for antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and natural killer (NK) cell activity in 51Cr-release and CD107a assays. *Journal of Immunological Methods*, 406, 1–9. DOI: 10.1016/j.jim.2014.01.017
6. Min B., Choi H., Her J. H., Jung M. Y., Kim H.-J., Jung M., Shin E.-C. (2018). Optimization of Large-Scale Expansion and Cryopreservation of Human Natural Killer Cells for Anti-Tumor Therapy. *Immune Network*, 18(4). DOI: 10.4110/in.2018.18.e31
7. Vashkevich E.P., Migas A.A., Meleshko A.N., Matveenko M.A., Strushkevich N.V., Shman T.V. (2020) Expansion and Activation of Human Natural Killer Cells ex vivo in the Presence of Transgenic Feeder Cells. *Cell and Tissue Biology*, vol. 14, no 5, pp. 365–371. DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.10.019
8. Zhu F., Heditke S., Kurtzberg J., Waters-Pick B., Hari P., Margolis D.A., Keever-Taylor C.A. (2015) Hydroxyethyl starch as a substitute for dextran 40 for thawing peripheral blood progenitor cell products. *Cytotherapy*, 17(12), 1813–1819. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.08.007
9. Pahl J.H.W., Koch J., Götz J.-J., Arnold A., Reusch U., Gantke T., Cerwenka A. (2018) CD16A Activation of NK Cells Promotes NK Cell Proliferation and Memory-Like Cytotoxicity against Cancer Cells. *Cancer Immunology Research*, 6(5), 517–527. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0550

Подана/Submitted: 11.10.2021

Принята/Accepted: 01.12.2021

Контакты/Contacts: zhenya_lasyukov@mail.ru