DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.4.005>
УДК 615.014.4:57.086.13:[616-018-007.62]:615.37

Вашкевич Е.П., Мигас А.А., Савич Ю.В., Жерносеченко А.А., Ласюков Е.А., Шман Т.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Vashkevich K., Migas A., Savich Yu., Zhernasechanka H., Lasiukov Ya., Shman T.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Влияние процедуры криоконсервирования на активацию и цитотоксическую активность экспансированных ЕК-клеток, полученных для адоптивной иммунотерапии

Influence of Cryopreservation Procedure
on Activation and Cytotoxicity of Expanded
NK Cells Obtained for Adoptive Immunotherapy

Резюме

Введение. Экспансия в присутствии генетически модифицированных фидерных клеток (ФК) является перспективным методом *ex vivo* получения большого количества естественных киллерных (ЕК) клеток для адоптивной иммунотерапии. Использование криоконсервированных ЕК-клеток имеет ряд преимуществ по сравнению с применением свежих клеток, среди которых: возможность проведения многократных инфузий клеток, полученных в одной серии; однородное качество клеточного продукта для всех доз. Важным аспектом при криоконсервировании экспансированных ЕК-клеток является сохранение их жизнеспособности и функциональной активности.

Цель. Анализ влияния процедуры криоконсервирования на активацию и цитотоксическую активность экспансированных *ex vivo* ЕК-клеток для целей адоптивной иммунотерапии.

Материалы и методы. ЕК-клетки экспансировали в присутствии интерлейкина-2 (ИЛ-2) и полученных ФК К-562-4-1BBL+мИЛ-21, после чего проводили криоконсервирование и хранение в парах жидкого азота. До и после криоконсервирования оценивали количество клеток, их жизнеспособность, субпопуляционный состав и цитотоксическую активность (ЦТА).

Результаты. При проведении экспансии получили клеточный продукт с высоким содержанием ЕК-клеток ($95,2 \pm 1,1\%$), характеризующихся высоким уровнем активации при оценке экспрессии маркеров CD69, NKp44 и ЦТА. Криоконсервирование незначительно изменяло относительное содержание ЕК, Т и ЕК-подобных Т (ЕКТ)-клеток в размороженных продуктах. При проведении размораживания выход абсолютного количества живых ЕК-клеток составил $66,1 \pm 6,7\%$. Достоверно были снижены показатели жизнеспособности, ЦТА и процента NKp44+ при неизменном уровне CD69+ ЕК-клеток. Дополнительная инкубация размороженных ЕК-клеток в полной питательной среде способствовала повышению ЦТА по сравнению с показателями непосредственно после размораживания.

Выводы. Использование ФК К-562-4-1BBL+мИЛ-21 позволяет получить *ex vivo* ЕК-клеточный продукт с высокой степенью чистоты, активации и противоопухолевой активности для целей

иммунотерапии. Криоконсервирование сохраняет субпопуляционный состав клеточного продукта, но снижает показатели жизнеспособности, ЦТА и итоговый выход ЕК-клеток.

Ключевые слова: ЕК-клетки, экспансия, криоконсервирование, иммунотерапия.

Abstract

Introduction. Ex vivo expansion in the presence of genetically modified feeder cells is a promising method to obtain a large number of natural killer (NK) cells for adoptive immunotherapy. The use of cryopreserved NK cells has a number of advantages over freshly generated cells: enabling multiple infusions from single expansion; uniform cell product quality for all doses. An important aspect in cryopreservation of expanded NK cells is the ability to preserve the cells without loss of their viability and functions.

Purpose. To analyze the effect of cryopreservation on the activation and cytotoxicity of ex vivo expanded NK cells for adoptive immunotherapy.

Materials and methods. NK cells were expanded in the presence of interleukin (IL)-2 and irradiated K-562-4-1BBL+mIL-21, followed by cryopreservation and storage in liquid nitrogen vapor. The number of cells, their viability, subpopulation composition, and cytotoxicity were assessed before and after cryopreservation.

Results. During the expansion, we yield a cell product with a high content of NK cells ($95.2 \pm 1.1\%$), characterized by a high levels of activation markers CD69, NKp44, and cytotoxicity. Cryopreservation slightly changed the relative content of the NK, T cells and NK-like T cells in thawed products. During thawing, the recovery of the absolute number of live NK cells was $66.1 \pm 6.7\%$. Viability, cytotoxicity and the percentage of NKp44+ were significantly reduced but the level of CD69+ NK cells was constant. Pre-incubation of thawed NK cells in complete medium enhanced their cytotoxicity compared to cytotoxicity values immediately after thawing.

Conclusions. Using K-562-4-1BBL+mIL-21 allows to obtain ex vivo NK-cell product with high purity, activation and antitumor activity for immunotherapy purposes. Cryopreservation maintains cell subpopulation composition of the product, but reduces the viability, cytotoxicity and the final recovery of NK cells.

Keywords: NK cells, expansion, cryopreservation, immunotherapy.

■ ВВЕДЕНИЕ

Получение большого количества ЕК-клеток с необходимой чистотой и степенью активации является одним из основных условий успешного применения данной группы лимфоцитов в адоптивной терапии онкологических заболеваний. Для этих целей разрабатываются и исследуются способы экспансии ЕК-клеток с использованием различных цитокинов или их комбинаций, моноклональных антител или облученных ФК [1]. Одним из перспективных методов является экспансия в присутствии генетически модифицированных клеток линии К-562, которые экспрессируют на своей поверхности молекулы, стимулирующие пролиферацию и активацию ЕК-клеток ex vivo [2, 3]. ЕК-клетки, полученные таким способом, широко используются в клинических исследованиях у пациентов с лейкозами, миеломной болезнью, нейробластомой и др. [4]. Криоконсервирование готовых экспансированных ЕК-продуктов позволяет обеспечить применение высоких доз ЕК-клеток либо их многократное

введение для достижения максимального противоопухолевого эффекта, а также обладает другими преимуществами: сокращением времени, необходимого на новую экспансию; использованием продуктов с однородными характеристиками; манипулированием сроками введения пациенту в зависимости от протоколов терапии; возможностью транспортировки. В ряде работ экспериментально показаны сохранение противоопухолевого потенциала экспансированных ЕК-клеток, подвергшихся криоконсервированию и последующему процессу размораживания, и возможность использования таких ЕК-продуктов в клинике [5–8].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ влияния процедуры криоконсервирования на активацию и цитотоксическую активность ЕК-клеток, полученных при *ex vivo* экспансии в присутствии ФК линии К-562 для целей адоптивной иммунотерапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспансия ЕК-клеток

Исходным материалом для проведения экспансии служили 8 образцов цельной периферической крови (ПК) доноров. Путем центрифугирования ПК на градиенте плотности 1,077 г/мл при 400g 30 мин получали МНК. Далее МНК инкубировали *in vitro* в культуральных флаконах (Sarstedt, Германия) в присутствии ФК и ИЛ-2 (50 МЕ/мл; препарат Ронколейкин, НПК «БИОТЕХ», Россия) в полной питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Gibco, США) в течение 12–19 суток. Соотношение МНК:ФК составило 2:1 на начало экспансии и 1:1 – на 7-е сутки. ФК представляют собой производную линии К-562, полученную в ходе исследования путем генетической модификации с целью эктопической экспрессии полноразмерного белка человека 4-1BBL и рекомбинантной мембранно-связанной формы ИЛ-21 человека (К-562-4-1BBL-мИЛ-21) [9]. Предварительно ФК были подвергнуты гамма-облучению в дозе 100 Гр и процедуре криоконсервирования.

Процедура криоконсервирования и размораживания

Полученные в ходе экспансии ЕК-клетки осаждали центрифугированием при 400g 15 минут, отмывали в 9 г/л растворе натрия хлорида (ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов», Беларусь), ресуспендировали в нем и переносили в предназначенные для хранения биологических продуктов криоконтейнеры (Macopharma, Франция). Затем постепенно смешивали с равным объемом криопротекторной среды, содержащей солевой 50 г/л раствор альбумина человека (ГУ «РНПЦТиМБ», Беларусь) и 200 г/л раствор диметилсульфоксида (ДМСО, Carl Roth GmbH, Германия). Дальнейшую процедуру криоконсервирования проводили на аппарате IceCube (Sy-Lab, Австрия). Хранили ЕК-продукты в парах жидкого азота в криохранилище MVE TEC 3000 (Chart Ind., США).

Размораживали ЕК-клетки при температуре 37 °С, постепенно смешивая с предварительно прогретой полной питательной средой, и ресуспендировали в ней для дальнейшего анализа.

Иммунофенотипический анализ

На этапах экспансии и криоконсервирования проводили подсчет клеток, а также оценку их субпопуляционного состава методом точной цитометрии. Для этого использовали соответствующие моноклональные антитела к CD3, CD56, CD69, NKp44 (CD336) (Beckman Coulter, США, Exbio, Чехия). Запись проводили на приборах Cytomics FC500 и DxFLEx, полученные результаты анализировали с использованием программ CXP Analysis и CytExpert (Beckman Coulter, США). Оценивали процентное содержание ЕК (CD3–CD56+), Т (CD3+CD56–) и ЕКТ (CD3+CD56+)–клеток, а также процент CD69 и NKp44 среди ЕК-клеток.

Прямой цитотоксический тест

Для оценки противоопухолевого потенциала экспансированных ЕК-клеток цитотоксический тест проводили в течение 1 ч. В качестве клеток-мишеней использовали культуру K562.GFP (генетически модифицированный вариант линии K-562, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок GFP), в качестве клеток-эффекторов – экспансированные ЕК-клетки до и после криоконсервирования. Соотношение эффектор:мишень составило 1:1, 5:1, 10:1. По окончании реакции в клеточную взвесь добавляли витальный краситель 7AAD (Beckman Coulter, США). Запись проводили на приборах Cytomics FC500 и DxFLEx, полученные результаты анализировали с использованием программ CXP Analysis и CytExpert (Beckman Coulter, США). Клетки-мишени выделяли по флуоресценции GFP (флуоресценция в зеленой области), а количество погибших клеток определяли по окрашиванию 7AAD (флуоресценция в красной области). Специфический лизис вычисляли по следующей формуле:

$$(\%7AAD+клеток_{опыт} - \%7AAD+клеток_{спонт}) / (100\% - \%7AAD+клеток_{спонт}) \times 100\%,$$

где $\%7AAD+клеток_{опыт}$ – процент лизированных клеток в опытных образцах при совместном культивировании мишеней и ЕК-клеток;
 $\%7AAD+клеток_{спонт}$ – спонтанный лизис клеток-мишеней.

Статистический анализ

Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ ошибка среднего. Сравнение вариационных рядов проводили в программе Statistica 12. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод экспансии ЕК-клеток в присутствии генетически модифицированной линии K-562, экспрессирующей молекулы 4-1BBL и МИЛ-15 или МИЛ-21, был впервые предложен исследовательскими группами D. Campana и D. Lee [2, 3]. Ранее нами было показано, что наибольшего прироста *in vitro* ЕК-клетки достигали при использовании варианта ФК K-562-4-1BBL-МИЛ21 – 21 590 (3151–304 328) раз против 371 (150–26 473) раза с использованием ФК K-562-4-1BBL-МИЛ15 [9]. На основании приведенных данных фидерная линия K-562-4-1BBL-МИЛ21 была выбрана для получения ЕК-клеток в терапевтических целях.

В данном исследовании для проведения экспансии из $85,2 \pm 8,4$ мл ПК 8 доноров было получено $135,0 \pm 13,0 \cdot 10^6$ МНК с содержанием CD3–CD56+ лимфоцитов, равным $14,0 \pm 3,0\%$. Продолжительность экспансии составила 12–19 суток. В результате долгосрочного культивирования получили общее количество клеток $2539,6 \pm 382,1 \cdot 10^6$, среди которых $95,2 \pm 1,1\%$, или $2452,3 \pm 384,3 \cdot 10^6$, были представлены ЕК-клетками. Таким образом, итоговый выход ЕК-клеток составил $17670,2 \pm 4664,1\%$. Далее образцы клеток были подвержены процедуре криоконсервирования.

В настоящее время для хранения ЕК-клеток применяются замораживающие составы на основе 5–10% ДМСО в качестве криопротектора и различных концентраций ЭТС (15–25%), альбумина (4–20%) или АВ-сыворотки (10–90%) человека [5–7, 10–14]. Нами была использована замораживающая среда, в которой конечная концентрация ДМСО и альбумина человека была равна 10% и 2,5%, соответственно. Количество экспансированных клеток в конечном объеме замораживающей среды $46,8 \pm 8,7$ мл составило $1350,0 \pm 278,5 \cdot 10^6$, среди которых $1304,5 \pm 277,4 \cdot 10^6$ – ЕК-клетки. Общая концентрация клеток в замораживаемых образцах была $30,6 \pm 3,8 \cdot 10^6$ млн в 1 мл, ЕК-клеток – $29,1 \pm 3,7 \cdot 10^6$ млн в 1 мл. Полученные образцы хранили в парах жидкого азота в течение 7–63 суток.

Ограниченное использование замороженных продуктов в клинике связано с имеющимися данными о снижении функциональной активности ЕК-клеток после криохранения. Рядом авторов установлено, что процедура замораживания/размораживания приводит к потерям количества ЕК-клеток и снижению их цитотоксической активности, несмотря на высокий уровень жизнеспособности [10, 11, 13, 15]. Показана низкая выживаемость размороженных экспансированных ЕК-клеток при использовании *in vivo* у мышей и у пациентов с рецидивом множественной миеломы [15, 16].

В то же время другими авторами показано отсутствие или незначительное влияние криохранения на функции ЕК-клеток (ЦТА, секреция цитокинов, дегрануляция) [5, 6, 12, 14]. Также описано, что экспансированные ЕК-клетки, введенные мышам с диссеминированной формой нейробластомы непосредственно после размораживания, оказывали противоопухолевый эффект, аналогичный незамороженным клеткам [6]. Инфузии нескольких доз экспансированных ЕК-клеток после их криохранения способствовали установлению ремиссии у части пациентов с острым миелоидным лейкозом [8].

В нашем исследовании была проведена оценка влияния криоконсервирования на жизнеспособность, субпопуляционный состав и ЦТА конечных ЕК-продуктов. Используемый в работе метод экспансии позволяет получить клеточный продукт с высоким содержанием активированных ЕК-клеток и низким содержанием ЕКТ- и Т-клеток по сравнению с данными показателями до начала экспансии [9]. Процедура замораживания/размораживания незначительно изменяла процент исследуемых популяций лимфоцитов в размороженных продуктах (см. таблицу).

При оценке экспрессии маркеров активации после криохранения было выявлено, что процент NKp44+ ЕК-клеток был достоверно ($p < 0,05$) меньше примерно на 10,6%, в то время как процент CD69+ ЕК-клеток оставался на прежнем уровне по сравнению с данными показателями

Субпопуляционный состав ЕК-продуктов до и после криоконсервирования

Subpopulation composition of NK-products before and after cryopreservation

Группа сравнения	ЕК-клетки, %	ЕКТ-клетки, %	Т-клетки, %
До криоконсервирования	95,2±1,1	2,0±0,6	2,3±0,6
После криоконсервирования	92,8±2,6	3,5±1,2	3,4±1,3

Рис. 1. Экспрессия CD69 и NКp44 на ЕК-клетках до и после криоконсервирования: * p<0,05

Fig. 1. Expression of CD69 and NKp44 on NK cells before and after cryopreservation: * p<0.05

до замораживания (рис. 1). Сохранение или незначительные изменения в экспрессии активационных рецепторов ЕК-клеток в размороженных продуктах показаны и в других исследованиях [12, 17].

После криохранения образцов экспансированных ЕК-продуктов и последующего размораживания жизнеспособность клеток была снижена примерно на 8,7% и составила 75,7±2,4% против 83,0±1,8% до процедуры криоконсервирования (p<0,05). Выход абсолютного количества живых ЕК-клеток составил 66,1±6,7%, или 977,5±269,3·10⁶.

Также нами был оценен противоопухолевый потенциал ЕК-клеток в прямом цитотоксическом тесте до и после проведения криоконсервирования. Для этого ЕК-клетки смешивали с чувствительной к их действию линией К-562. ЦТА экспансированных ЕК-клеток была дозозависимой. Уже при соотношении эффектор:мишень 1:1 специфический лизис опухолевых клеток составлял в среднем 49,2% и достигал 91,0% при соотношении 10:1. Цитотоксичность ЕК-клеток непосредственно после размораживания была достоверно (p<0,05) снижена, что особенно заметно при соотношении эффектор:мишень 1:1 (рис. 2А). Предварительная инкубация размороженных клеток в полной питательной среде в течение 1 ч до постановки теста повышала ЦТА ЕК-клеток при соотношениях 5:1 и 10:1, однако при анализе парных случаев (n=4) такое повышение было недостоверным (рис. 2В).

Исследование Berg M. и соавт. выявило прямую корреляцию между снижением ЦТА экспансированных ЕК-клеток и снижением уровня экспрессии NKG2D и TRAIL на них сразу после размораживания [13]. Повысить ЦТА можно путем культивирования ЕК-клеток с ИЛ-2 или без [5, 10, 11, 13, 15]. В ряде исследований также отмечали, что дополнительная

Рис. 2. Цитотоксическая активность ЕК-клеток: А – до и после криоконсервирования: * $p < 0,05$; В – непосредственно после процедуры размораживания и через 1 ч после инкубации в полной питательной среде

Fig. 2. NK cells cytotoxicity: А – before and after cryopreservation: * $p < 0,05$; В – immediately after the thawing and 1 hour after incubation in complete medium

инкубация с ИЛ-2 приводила к потере количества или снижению жизнеспособности ЕК-клеток, что может ограничивать их дальнейшее использование [10, 13, 15].

Снижение ЦТА и жизнеспособности ЕК-клеток также может быть связано с составом замораживающей среды. Установлена прямая зависимость между процентным содержанием АВ-сыворотки и сохранением количества, жизнеспособности и функций ЕК-клеток [18]. Показана зависимость жизнеспособности МНК после размораживания от концентрации ДМСО [19]. В настоящее время ведутся исследования по использованию альтернативных биосовместимых криопротекторов (на основе декстрана, сахаров, полимеров и др.) для исключения токсичного действия ДМСО [20, 21].

■ ВЫВОДЫ

1. Экспансия ЕК-клеток *ex vivo* в присутствии ФК К-562-4-1ВВЛ+мИЛ-21 позволяет получить ЕК-клеточный продукт с высокой степенью чистоты, активации и противоопухолевой активности для целей иммунотерапии.
2. В процессе криоконсервирования сохраняется относительное содержание ЕК-, Т- и ЕКТ-клеток и высокий процент ЕК-клеток, экспрессирующих активационный маркер CD69. Показано достоверное снижение процента NKp44+ ЕК-клеток. Сниженную после процесса размораживания ЦТА ЕК-клеток можно повысить путем дополнительного культивирования в полной питательной среде.
3. Процедура криоконсервирования снижает итоговый выход живых экспансированных ЕК-клеток, что необходимо учитывать при расчете дозы для инфузий пациентам.

Вклад авторов: Вашкевич Е.П. – экспансия и размораживание ЕК-клеток, постановка цитотоксического теста, иммунофенотипирование, написание текста; Мигас А.А. – получение генетически модифицированных фидерных клеток, редактирование текста; Савич Ю.В., Жерносеченко А.А. – криоконсервирование ЕК-клеток; Ласюков Е.А. – иммунофенотипирование; Шман Т.В. – экспансия ЕК-клеток, постановка цитотоксического теста, редактирование текста.

Authors' contribution: Vashkevich K. – expansion and thawing of NK cells, cytotoxicity assay, immunophenotyping, text writing; Migas A. – generation of genetically modified feeder cells, text editing; Savich Yu., Zhernasechanka A. – cryopreservation of NK cells; Lasiukov Ya. – immunophenotyping; Shman T. – expansion of NK cells, cytotoxicity assay, text editing.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Liu S., Galat V., Galat Y., Lee Y.K.A., Wainwright D., Wu J. (2021) NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol*, vol. 14, no 1, article 7. doi:10.1186/s13045-020-01014-w
2. Imai C., Iwamoto S., Campana D. (2005) Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*, vol. 106, no 1, pp. 376–383.
3. Denman C.J., Senyukov V.V., Somanchi S.S., Phatarpekar P.V., Kopp L.M., Johnson J.L., Singh H., Hurton L., Maiti S.N., Huls M.H., Champlin R.E., Cooper L.J.N., Lee D.A. (2012) Membrane-bound IL-21 promotes sustained Ex Vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*, vol. 7, iss. 1, e30264. doi:10.1371/journal.pone.0030264
4. Lee D.A. (2019) Cellular therapy: adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunol Rev*, vol. 290, no 1, pp. 85–99.
5. Min B., Choi H., Her J.H., Jung M.Y., Kim H.-J., Jung M.-Y., Lee E.-K., Cho S.Y., Hwang Y.K., Shin E.-C. (2018) Optimization of Large-Scale Expansion and Cryopreservation of Human Natural Killer Cells for Anti-Tumor Therapy. *Immune Netw*, vol. 18, no 4, e31. doi:10.4110/in.2018.18.e31
6. Liu Y., Wu H.-W., Sheard M.A., Srinivas R., Somanchi S.S., Cooper L.J.N., Lee D.A., Seeger R.C. (2013) Growth and Activation of Natural Killer Cells Ex Vivo from Children with Neuroblastoma for Adoptive Cell Therapy. *Clin Cancer Res*, vol. 19, no 8, pp. 2132–2143.
7. Cuireia S.O., Schafer J.R., Bassett R., Denman C.J., Cao K., Willis D., Rondon G., Chen J., Soebbing D., Kaur I., Gulbis A., Ahmed S., Rezvani K., Shpall E.J., Lee D.A., Champlin R.E. (2017) Phase 1 clinical trial using mblL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood*, vol. 130, no 16, pp. 1857–1868.
8. Cuireia S.O., Silla L., Cao K., Rezvani K., Cooper L., Champlin R.E. (2018) Initial results of two phase I trials delivering mblL-21 ex vivo expanded haploidentical NK cells after fludarabine/cytarabine for patients with relapsed/refractory myeloid leukemias. *J Clin Oncol*, vol. 36, iss. 15, suppl., p. 7008. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.7008
9. Vashkevich E.P., Migas A.A., Melesko 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.
10. Voshol H., Dullens H.F.J., Otter W.D., Vliegenthart J.F.G. (1993) Human natural killer cells: a convenient purification procedure and the influence of cryopreservation on cytotoxic activity. *J Immunol Methods*, vol. 165, iss. 1, pp. 21–30.
11. Lapteva N., Durett A.G., Sun J., Rollins L.A., Huye L.L., Fang J., Dandekar V., Mei Z., Jackson K., Vera J., Ando J., Ngo M.C., Coustan-Smith E., Campana D., Szmania S., Garg T., Moreno-Bost A., Vanrhee F., Gee A.P., Rooney C.M. (2012) Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*, vol. 14, iss. 9, pp. 1131–1143.
12. Domogala A., Madrigal J.A., Saudeumont A. (2016) Cryopreservation has no effect on function of natural killer cells differentiated in vitro from umbilical cord blood CD34+ cells. *Cytotherapy*, vol. 18, iss. 6, pp. 754–759.
13. Berg M., Lundqvist A., McCoy P. JR., Samsel L., Fan Y., Tawab A., Childs R. (2009) 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*, vol. 11, no 3, pp. 341–355.
14. Torelli G.F., Rozera C., Santodonato L., Peragine N., D'agostino G., Montefiore E., Napolitano M.R., Monque D.M., Carlei D., Mariglia P., Pauselli S., Gozzer M., Bafti M.S., Girelli G., Guarini A., Belardelli F., Foà R. (2015) A good manufacturing practice method to ex vivo expand natural killer cells for clinical use. *Blood Transfus*, vol. 13, no 3, pp. 464–471.
15. Miller J.S., Rooney C.M., Curtsinger J., McElmurry R., McCullar V., Verneris M.R., Lapteva N., McKenna D., Wagner J.E., Blazar B.R., Tolar J. (2014) Expansion and Homing of Adoptively Transferred Human Natural Killer Cells in Immunodeficient Mice Varies with Product Preparation and In Vivo Cytokine Administration: Implications for Clinical Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 20, iss. 8, pp. 1252–1257.
16. Szmania S., Lapteva N., Lingo J.D., Greenway A.D., Stone K., Woods E., Khan J., Stivers J., Nair B., Baxter-Low L.A., Bost A., Campana D., Epstein J., Gee A.P., Brenner M.K., Usmani S.Z., Waheed S., Rooney C.M., Cottler-Fox M., Barlogie B., Rhee F. (2012) Fresh Ex Vivo Expanded Natural Killer Cells Demonstrate Robust Proliferation in Vivo in High-Risk Relapsed Multiple Myeloma (MM) Patients. *Blood*, vol. 120, iss. 21, p. 579.
17. Oh E., Min B., Li Y., Lian C., Hong J., Park G.M., Yang B., Cho S.Y., Hwang Y.K., Yun C.O. (2019) Cryopreserved Human Natural Killer Cells Exhibit Potent Antitumor Efficacy against Orthotopic Pancreatic Cancer through Efficient Tumor-Homing and Cytolytic Ability. *Cancers*, vol. 11, iss. 7, article 966. doi:10.3390/cancers11070966
18. Cobanoglu Z.E., Lee D.A., Senyukov V. (2014) Optimal Cryopreservation Conditions to Preserve Viability, Proliferation, and Lytic Function of. *Biol Blood Marrow Transplant*, vol. 20, iss. 2, suppl., p. S129.
19. Nazarpour R., Zabihi E., Alijanpour E., Abedian Z., Mehdizadeh H., Rahimi F. (2012) Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. *Int J Mol Cell Med*, vol. 1, no 2, pp. 88–93.
20. Assal R.E., Abou-Elkacem L., Tocchio A., Pasley S., Matosevic S., Kaplan D.L., Zylberberg C., Demirci U. (2019) Bioinspired Preservation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Adv Sci*, vol. 6, iss. 6, article 1802045. doi:10.1002/advsc.201802045
21. Yao X., Jovevski J.J., Todd M.F., Xu R., Li Y., Wang J., Matosevic S. (2020) Nanoparticle-Mediated Intracellular Protection of Natural Killer Cells Avoids Cryoinjury and Retains Potent Antitumor Functions. *Adv Sci*, vol. 7, iss. 9, article 1902938. doi:10.1002/advsc.201902938

Подана/Submitted: 11.10.2021

Принята/Accepted: 01.12.2021

Контакты/Contacts: katsiaryna.vashkevich@gmail.com