

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ АКТИВИРУЮЩЕГО РЕЦЕПТОРА NKG2D НА НК-КЛЕТКАХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ MICA

Абакушина Е.В.¹, Лысюк Е.Ю.^{2,3}, Посвятенко А.В.^{2,3,4},
Кибардин А.В.^{2,3}

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

² ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Нестабильность генома трансформированных клеток как одна из основных причин опухолевого роста может приводить к появлению в клетке ряда атипичных белков. Такие белки могут распознаваться иммунной системой и приводить к уничтожению измененных клеток. С другой стороны, фенотипическая нестабильность может влиять на появление трансформированных клеток, напрямую подавляющих эффекторное звено иммунного ответа и/или не распознаваемых цитотоксическими лимфоцитами. Одним из наиболее важных активирующих рецепторов, экспрессируемых НК-клетками, является рецептор NKG2D, необходимый для обнаружения и уничтожения трансформированных и инфицированных клеток. Лигандами для NKG2D являются поверхностные или свободно циркулирующие стресс-индуцируемые неканонические молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса MICA/B (MHC class I chain-related proteins A and B). MICA и MICB отсутствуют или слабо экспрессируются в большинстве нормальных клеток. В то же время в опухолевых и инфицированных вирусами клетках их количество существенно повышено. Взаимодействие NKG2D со своими лигандами играет важную роль в регуляции противоопухолевых иммунных реакций. Так, накопление в крови растворимой формы MICA за счет протеолитического шеддинга с поверхности опухолевых клеток может блокировать NKG2D-опосредованную противоопухолевую цитотоксичность и, таким образом, способствовать ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке блокирующего эффекта растворимого рекомбинантного белка MICA человека (rhMICA) на рецептор НК-клеток NKG2D. Для этого выделенные из периферической крови мононуклеарные клетки обрабатывали различными концентрациями

Адрес для переписки:

Абакушина Елена Вячеславовна
Медицинский радиологический научный центр
им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский радиологический центр»
Министерства здравоохранения РФ
249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск,
ул. Королева, 4.
Тел.: 8 (903) 814-33-82.
Факс: 8 (495) 956-14-40.
E-mail: abakushina@mail.ru

Address for correspondence:

Abakushina Elena V.
A. Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the
National Medical Research Radiological Centre
249036, Russian Federation, Kaluga Region, Obninsk,
Koroleva str., 4.
Phone: 7 (903) 814-33-82.
Fax: 7 (495) 956-14-40.
E-mail: abakushina@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Абакушина, Е.Ю. Лысюк, А.В. Посвятенко,
А.В. Кибардин «Ингибирование экспрессии активирующего
рецептора NKG2D на НК-клетках рекомбинантным
белком MICA» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19,
№ 1. С. 81–88. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-81-88

© Абакушина Е.В. и соавт., 2017

For citation:

E.V. Abakushina, E.Yu. Lyssuk, A.V. Posvyatenko, A.V. Kibardin
“Inhibition of the NKG2D activating receptor expression on cytotoxic
lymphocytes by recombinant MICA protein”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1,
pp. 81–88. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-81-88

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-81-88>

(0, 1, 5 и 10 мкг/мл) растворимого рекомбинантного белка человека MICA, после чего клетки окрашивали антителами против CD314 (NKG2D) и проводили цитометрический анализ CD3⁺CD56⁺NK-клеток. Кроме того, аналогично анализировали активированные IL-2 и IL-15 лимфоциты больного меланомой. Показано, что кратковременная обработка лимфоцитов rhsMICA значительно снижает экспрессию рецептора NKG2D на цитотоксических лимфоцитах как у здоровых доноров, так и у больных меланомой, при этом изменения зависят от дозы rhsMICA. В то же время после активации цитокинами лимфоциты становятся, по всей видимости, более устойчивыми к ингибирующему воздействию rhsMICA, в результате чего значимого снижения экспрессии NKG2D на активированных NK-клетках не происходит. Данный факт дает предпосылки к использованию активированных NK-клеток для адоптивной иммунотерапии онкологических больных с MICA-позитивными опухолями.

Ключевые слова: NK-клетки, активирующий рецептор NKG2D, NKG2D лиганды, стресс-индуцированные молекулы MICA, ингибирование NKG2D

INHIBITION OF THE NKG2D ACTIVATING RECEPTOR EXPRESSION ON CYTOTOXIC LYMPHOCYTES BY RECOMBINANT MICA PROTEIN

Abakushina E.V.^a, Lyssuk E.Yu.^{b, c}, Posvyatenko A.V.^{b, c, d},
Kibardin A.V.^{b, c}

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^d N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Genome instability of transformed cells, being the most common factor of malignancy, may result into production of abnormal proteins in these cells. Normally, the newly formed proteins are recognized by immune system, thus causing elimination of the transformed cells. Nevertheless, the phenotypic instability promotes formation of specific transformed cells which suppress effector immune reactions and/or are unrecognizable by cytotoxic lymphocytes.

NKG2D is one of the most important activating receptors expressed by NK cells. It serves as a major recognition receptor for detection and elimination of tumor and infected cells. The ligands for NKG2D include surface or circulating non-canonical MICA/B molecules from class I major histocompatibility complex (MHC class I chain-related proteins A and B). MICA and MICB are expressed scarcely, if at all, by the most normal cells, being, however, upregulated in cancer cells and virus-infected cells. NKG2D receptor-ligand interaction is important for regulation of anti-tumor immune reactions. The soluble form of MICA accumulated in blood due to proteolytic shedding from tumor cell membranes is able to inhibit the NKG2D mediated anti-tumor cytotoxicity and, therefore, promote the immune escape. The aim of our study was to estimate blocking effects of soluble recombinant human MICA protein (rhsMICA) upon NKG2D receptor of NK cells.

Mononuclear cells were isolated from peripheral blood, followed by incubation with of rhsMICA at different concentrations (0, 1, 5, or 10 µg/ml), staining with anti-CD314 (NKG2D) mAbs on the CD3⁺CD56⁺NK cells, and flow cytometry analysis. A similar treatment protocol was applied for IL2- and IL15-activated mononuclear cells isolated from the melanoma patients.

It has been shown that brief incubation of lymphocytes with rhsMICA caused a significantly reduced expression of NKG2D receptor on the surface of cytotoxic lymphocytes, both from healthy donors and melanoma patients. These changes depended on the MICA dose. Meanwhile, the cytokine-activated lymphocytes seem to become more resistant to inhibiting effects of rhsMICA, and, thus, do not cause any significant reduction of NKG2D expression on the activated NK cells. This fact may be a pre-requisite for usage of activated NK-cells for adoptive immunotherapy of cancer patients with MICA-positive malignancies.

Keywords: NK cells, NKG2D activating receptor, NKG2D ligands, stress-induced MICA, NKG2D inhibition

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00105) и гранта Президента НШ-9069.2016.4.

Введение

В настоящее время эффект ускользания опухоли от иммунного надзора изучен не полностью [7], но некоторые механизмы этого феномена уже достаточно хорошо известны [6] и позволяют продолжать поиск эффективных и безопасных способов лечения онкологических заболеваний. Основной причиной опухолевого роста как стадийного процесса превращения нормальной соматической клетки в опухолевую является нестабильность генома трансформированных клеток [5]. В результате этого процесса в клетке обычно появляется ряд атипичных, измененных белковых молекул, которые теоретически могут распознаваться и уничтожаться иммунной системой. Одновременно с этим изменчивость фенотипа трансформированной клетки создает возможность для селекции вариантов клеток, которые не несут антигенных детерминант, распознаваемых лимфоцитами либо же подавляют эффекторное звено иммунного ответа [7]. Таким образом, генетическая нестабильность является одновременно причиной возникновения иммуногенности опухолей и причиной, по которой опухолевый рост чрезвычайно сложно контролировать как иммунологическими, так и любыми другими терапевтическими средствами. Достоверно показано, что иммунная система способна распознавать злокачественные клетки и реагировать на такое распознавание активацией и последующими каскадами иммунных реакций [14]. Одним из последствий активации сигнальных каскадов в опухолевой клетке является экспрессия на клеточной поверхности стресс-индуцированных молекул MICA и MICB, относящихся к семейству неканонических молекул гистосовместимости класса I (MHC class I-related molecules) [12]. Взаимодействие экспонированных на поверхности опухолевых клеток либо свободно циркулирующих в кровотоке молекул MICA с активирующим рецептором NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов NKG2D играет важную роль в регуляции противоопухолевых иммунных реакций [15]. Накопление растворимых форм лиганда MICA (sMICA) в сыворотке крови негативно сказывается на NKG2D-зависимой клеточной цито-

токсичности и может приводить к подавлению иммунного ответа [1, 8].

Рядом авторов было показано, что протеолитический шеддинг белка MICA с поверхности опухолевых клеток с образованием sMICA может приводить к анергии эффекторных клеток за счет уменьшения поверхностной экспрессии активирующего рецептора NKG2D, что определяет механизм уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора [10, 13].

Некоторыми исследователями показано, что только 11,4% клеток-мишеней K562 экспрессируют стресс-индуцированные молекулы MICA, но успешно уничтожаются NK-клетками посредством контактного цитолиза [11]. Блокировка поверхностной экспрессии NKG2D приводит к ингибированию этого лиганд-рецепторного взаимодействия. В других экспериментальных статьях показано, что противоопухолевая активность NK-клеток не зависит от происхождения и типа роста клеток-мишеней, а определяется лишь наличием поверхностных маркеров на клетке-мишени [8]. Именно поэтому важно понимание механизма экспрессии и сбрасывания лигандов NKG2D, что приводит к активации или анергии эффекторов, а также является результатом взаимодействия растворимых форм MICA с активирующим рецептором NKG2D на поверхности цитотоксических лимфоцитов.

Целью исследования явилась оценка блокирующего эффекта растворимого рекомбинантного человеческого белка MICA (rhsMICA) на активирующий рецептор цитотоксических лимфоцитов человека NKG2D.

Материалы и методы

В работе использовали периферическую кровь 5 здоровых доноров старше 18 лет и больного меланомой. Объектом исследования служила периферическая венозная кровь, полученная путем пункции локтевой вены и собранная в вакуумные пробирки с добавлением КЗЭДТА. Мононуклеарные клетки выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фикола (Ficoll-Paque™ Premium; density 1,077; GE Healthcare). Рекомбинантный белок rhsMICA (ЗАО «Протеинсинтез», Россия) разводили в концентрации 50 мкг/мл в фосфатном буферном растворе (ФСБ). Полученную после выделения мононуклеарной фракции клеточную суспензию разводили до концентрации $1-2 \times 10^6$ клеток/мл в ФСБ. В пробирки

вносили необходимое количество рекомбинантного белка для получения конечной концентрации 0 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл rhsMICA. Далее клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре и отмывали в ФСБ центрифугированием.

Для активации моноклеарные клетки помещали в 24-луночный планшет (Costar, США) в концентрации $1-2 \times 10^6$ клеток/мл по 1 мл в каждую лунку и на протяжении 4 дней культивировали в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) с добавлением IL-2 в концентрации 250 МЕ/мл (Ронколейкин, Биотех, Россия) и IL-15 (ImmunoTools, Германия) в концентрации 50 нг/мл. Культивирование проводилось в CO₂ инкубаторе во влажной атмосфере при 37 °С. Через 48 часов половину питательной среды заменяли новой [2, 3].

В работе оценивали субпопуляционный состав Т- и НК-лимфоцитов периферической крови и маркера активации NKG2D (CD314) на Т- и НК-клетках сразу после выделения и после активации на протяжении 4 дней. Для этого проводили цитофлуориметрический анализ с использованием меченых антител анти-CD56-FITC (eBioscience, США, clone MEM188), CD3-PC5.5 (Beckman Coulter IOTest® #PN A66327), CD314-PE (= NKG2D) (eBioscience, США, clone 1D11), CD25-FITC (ImmunoTools, Германия, #21810253sp), CD69-PE (ImmunoTools, Германия, #21620694 или Beckman Coulter IOTest, США, #PN IM1943U) и CD16-PC5 (Beckman Coulter IOTest, США, #A07767 100 t). Использовали соответствующие флуорохромам изотипические контроли анти-IgG1 (Beckman Coulter IOTest, США). Экспрессию CD314 анализировали на поверхности CD3-CD56⁺ лимфоцитов с помощью трехпараметрического цитометрического анализа CD314-PE/ CD56-FITC/ CD3-PC5.5 на проточном цитометре (Cytomics FC 500 MPL, Beckman Coulter).

Для цитометрического анализа клетки окрашивали в соответствии с рекомендациями фирм-производителей антител: к ресуспендированным в ФСБ моноклеарным клеткам добавляли требуемые количества антител в соответствии с протоколом исследования, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и отмывали образцы в ФСБ, содержащем 1% ЭТС, путем центрифугирования при 350 g 10 мин. Супернатант отбирали,

а осадок в каждой пробирке разводили в 0,3 мл ФСБ.

Анализ проводили немедленно после окрашивания, анализировали не менее 5000 событий в секторе живых клеток. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы CXP Analysis 2.2 (Beckman Coulter).

Статистический анализ данных проводили с помощью программ Microsoft Excel 2003 и Statsoft Statistica 6.0. Данные представляли как среднее по группе $\pm$ стандартное отклонение (SD). Для сравнения показателей использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В данной работе проведен анализ влияния rhsMICA на поверхностную экспрессию рецептора NKG2D (CD314) на НК-клетках периферической крови здоровых людей и больных меланомой. В качестве источника rhsMICA использован человеческий рекомбинантный белок MICA в концентрациях 1, 5 и 10 мкг/мл.

Было проведено исследование по кратковременному блокированию рецептора NKG2D рекомбинантным белком MICA в течение 30 минут. В работе использовали моноклеарные клетки здоровых доноров сразу после выделения и активированные моноклеары больного меланомой на 4 день культивирования в присутствии IL-2 и IL-15. Показано, что НК-клетки (CD314⁺CD3⁻CD56⁺) больного меланомой экспрессируют NKG2D в 58,1%. После активации количество NKG2D⁺ НК-клеток увеличивается в 1,4 раза (рис. 1).

Было установлено, что кратковременная инкубация свежевыделенных лимфоцитов больного с различными концентрациями rhsMICA приводит к резкому снижению уровня поверхностной экспрессии CD314 на НК-клетках с 58,1 до 5,8% в зависимости от концентрации белка. При активации лимфоцитов больного меланомой поверхностная экспрессия NKG2D на НК-клетках возрастает до 84,3%. При кратковременной инкубации лимфоцитов с rhsMICA в различных концентрациях снижения экспрессии CD314 не произошло. Наоборот, прослеживается тенденция к незначительному увеличению NKG2D⁺ лимфоцитов среди субпопуляции НК-клеток (рис. 1).

Экспрессия NKG2D была выявлена на поверхности более 90% активированных НК-

клеток и существенно не изменялась при инкубировании с различными концентрациями рекомбинантного белка, несмотря на то, что использованный в эксперименте для обработки клеток максимальный уровень sMICA превышал таковой у онкологических больных в 10^3 - 10^4 раз. Возможно, это связано с тем, что нативные лимфоциты у больных меланомой более подвержены ингибирующему воздействию растворимых лигандов рецептора NKG2D. При активации лимфоциты изменяют свой потенциал и становятся более устойчивыми к негативному воздействию, вероятно, за счет предшествующего культивирования моноклеарных клеток в присутствии IL-2 и IL-15 на протяжении 4 дней. Возможно, что в этом случае интерлейкины могут выступать в качестве источников дополнительных сигналов активации. Данный факт свидетельствует в пользу того, что у активированных лимфоцитов максимально увеличивается экспрессия CD314. За счет этого они обладают повышенной функциональной активностью и могут быть использованы для адоптивной иммунотерапии даже у больных при наличии высоких концентраций растворимых форм молекул MICA в периферической крови.

Также в работе было продемонстрировано, что присутствие растворимой формы молекулы rhsMICA приводит к увеличению доли NK-клеток в субпопуляции моноклеаров и повышению экспрессии на их поверхности маркеров ранней (CD69) и более поздней активации (CD25) (рис. 2). Так, обработка клеток высокими концентрациями белка rhsMICA в течение 30 минут приводила к достоверному увеличению данных показателей на лимфоцитах по сравнению с не-обработанными лимфоцитами.

Таким образом, показано, что обработка лимфоцитов рекомбинантным MICA значительно снижает экспрессию рецептора NKG2D только у не активированных NK-клеток как больных меланомой, так и здоровых доноров, что подтверждает полученные нами ранее данные в системе растворимого белка sMICA, получаемого из супернатанта клеточной линии В-лимфомы человека C1R-MICA и хорошо согласуется с литературными данными [8, 9]. Как было показано ранее, суточная инкубация эффекторов в присутствии супернатанта, содержащего sMICA, приводит к снижению экспрессии NKG2D и ингибированию их способности лизировать клетки-мишени линии K562. С другой стороны, кратко-

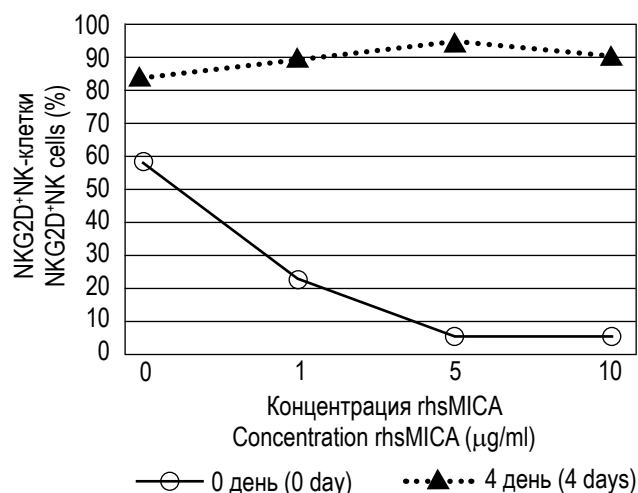


Рисунок 1. Ингибирование экспрессии рецептора NKG2D с помощью рекомбинантного человеческого белка MICA (rhsMICA) на поверхности NK-клеток больной меланомой сразу после выделения моноклеарных клеток (0 день) и на 4 день после активации

Figure 1. Inhibition of NKG2D receptor expression on the surface of NK cells from melanoma patient by means of recombinant human protein MICA (rhsMICA) observed with freshly isolated mononuclear cells (day 0, circles), and on day 4 after activation (triangles).

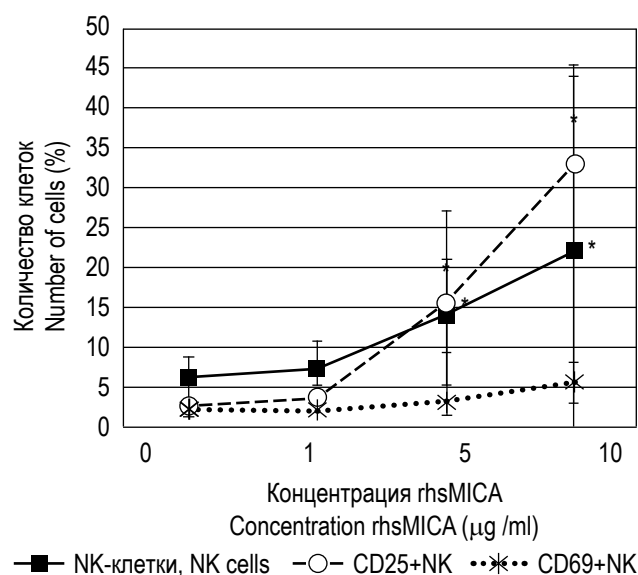


Рисунок 2. Изменение экспрессии рецепторов NK-клеток и маркеров активации CD25 и CD69 на поверхности NK-клеток здоровых доноров сразу после выделения ПМН и инкубации в присутствии различных концентраций рекомбинантного человеческого белка MICA (rhsMICA)
Примечание. * – достоверно значимые отличия количества клеток в зависимости от концентрации rhsMICA ($p < 0.05$)

Figure 2. Changes in expression of surface NK cells receptors and activation markers (CD25 and CD69) of healthy donors observed with freshly isolated mononuclear cells, and following incubation with recombinant human protein MICA (rhsMICA) at different concentrations.

Note. * – significant differences in cell numbers, dependent of rhsMICA concentrations ($p < 0.05$).

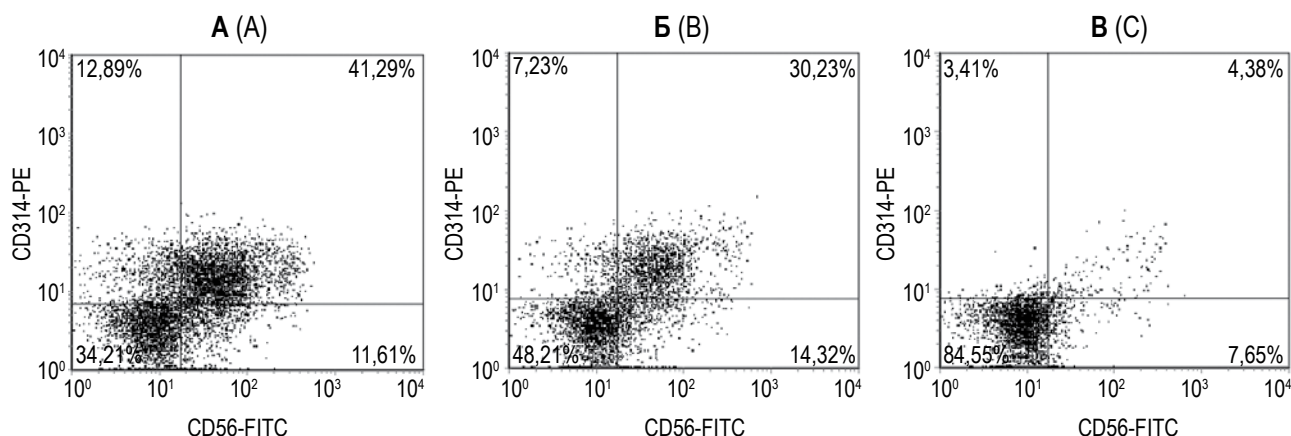


Рисунок 3. Ингибирование NKG2D высокими концентрациями rhsMICA на CD3⁺CD56⁺ лимфоцитах здорового донора (типичный пример)

Примечание. Без обработки rhsMICA (А), обработка мононуклеаров rhsMICA в концентрации 1 мкг/мл (Б) и 5 мкг/мл (В).

Figure 3. NKG2D inhibition on CD3⁺CD56⁺ lymphocytes of a healthy donor at high rhsMICA concentrations (typical pattern).

Note. A – without rhsMICA treatment; B – incubation with rhsMICA (1 µg/ml); C – with rhsMICA (5 µg/ml).

срочная инкубация мононуклеарных клеток здоровых доноров увеличивает поверхностную экспрессию маркеров активации, что отражает их способность к увеличению функциональной активности. Результаты данной работы подтверждают полученные ранее данные об увеличении количества НК-клеток и повышении экспрессии маркеров активации в группе больных раком желудка, кишечника и меланомой с высоким уровнем сывороточного sMICA [1, 2, 3, 4].

В данной экспериментальной системе у здоровых добровольцев продемонстрировано ингибирующее действие высоких концентраций rhsMICA на экспрессию NKG2D (рис. 3). Показано, что после активации в присутствии IL-2 и IL-15 цитотоксические лимфоциты обладают повышенной экспрессией CD314, которая не ингибируется в полной мере, несмотря на присутствие rhsMICA. Таким образом, активация лимфоцитов *in vitro* может являться одним из подходов к иммунотерапии опухолей.

Полученные экспериментальные данные указывают на наличие опосредованных NKG2D механизмов регуляции функций естественных киллеров при взаимодействии с клетками-мишенями, экспрессирующими лиганды NKG2D

и растворимыми формами этих молекул как у здоровых доноров, так и у онкологических больных.

Заключение

В системе *in vitro* продемонстрировано rhsMICA-зависимое угнетение экспрессии активирующего рецептора NKG2D на НК-клетках здоровых людей и больных меланомой. После активации мононуклеарных клеток *in vitro* экспрессия NKG2D возрастает, что подтверждает полученные нами ранее данные на большем количестве онкологических больных [2, 3].

Таким образом, в экспериментальной модели нами показано, что резкое повышение уровня sMICA в культуральной среде приводит к снижению уровня экспрессии одного из основных активирующих рецепторов цитотоксических лимфоцитов, NKG2D, что предполагает участие сывороточных молекул sMICA в супрессии противоопухолевого иммунного ответа. Полученные данные необходимо учитывать при разработке подходов к адоптивной иммунотерапии активированными НК-клетками онкологических больных с MICA-позитивными опухолями или высоким титром MICA в периферической крови.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Неприна Г.С., Пасова И.А., Бердов Б.А., Клинова А.В., Коваленко Е.И., Каприн А.Д. Повышение уровня цитокинов и стресс-индуцированных молекул MICA в сы-

воротке крови больных раком желудка и толстой кишки // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 1. С. 63-67. [Abakushina E.V., Abakushin D.N., Neprina G.S., Pasova I.A., Berdov B.A., Klinkova A.V., Kovalenko E.I., Kaprin A.D. Elevation of serum levels of cytokines and stress-induced molecules MICA in patients with gaster and colon cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 1. pp. 63-67. (In Russ.)]

2. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Каприн А.Д. Морфо-функциональная характеристика лимфоцитов человека после активации *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016. Т. 161, № 5. С. 678-683. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Kaprin A.D. The morpho-functional characteristic of human lymphocytes after activation *in vitro*. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, no. 5, pp. 678-683. (In Russ.)]

3. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С. Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro* // Гены и клетки, 2015. Т. 10, № 2. С. 78-85. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S. Efficiency of IL-2 and IL-15 combined use for activation of cytotoxic lymphocytes *in vitro*. *Geny i kletki = Gene and Cells*, 2015, Vol. 10, no. 2, pp. 78-85. (In Russ.)]

4. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С., Кудрявцев Д.В., Кудрявцева Г.Т., Селиванова Н.В. Фенотип лимфоцитов у больных меланомой кожи после иммунотерапии активированными лимфоцитами // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 6. С. 567-576. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S., Kudryavtsev D.V., Kudryavtseva G.T., Selivanova N.V. Lymphocyte phenotype in patients with skin melanoma after immunotherapy of activated lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 6, pp. 567-576. (In Russ.)] DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-6-567-576>

5. Бережной А.Е., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Козлов А.М., Ларин С.С. Молекулярные механизмы взаимодействия опухоли и иммунной системы // Вопросы онкологии, 2008. Т. 54, № 6. С. 669-683. [Berezhnoy A.E., Gnouchiev N.V., Georgiev G.P., Kozlov A.M., Larin S.S. Molecular mechanisms of interaction between the tumor and the immune system. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2008, Vol. 54, no. 6, pp. 669-683. (In Russ.)]

6. Бережной А.Е., Чернышева А.Д., Закеева И.Р., Данилова А.Б., Данилов А.О., Моисеенко В.М., Geraghty D., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Кибардин А.В., Ларин С.С. Индукция экспрессии молекулы HLA-E на поверхности опухолевых клеток интерфероном-гамма приводит к защите опухолевых клеток от цитотоксического действия лимфоцитов // Вопросы онкологии, 2009. Т. 55, № 2. С. 224-229. [Berezhnoy A.E., Chernysheva A.D., Zakeeva I.R., Danilova A.B., Danilov A.O., Moiseyenko V.M., Geraghty D., Gnouchiev N.V., Georgiyev G.P., Kibardin A.V., Larin S.S. HLA-E molecule induction on the surface of tumor cells protects them from cytotoxic lymphocytes. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2009, Vol. 55, no. 2, pp. 224-229. (In Russ.)]

7. Закеева И.Р., Бережной А.Е., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Ингибиторные рецепторы лимфоцитов и их роль в противоопухолевом иммунитете // Вопросы онкологии, 2007. Т. 53, № 2. С. 140-149. [Zakeeva I.R., Berezhnoy A.E., Gnouchiev N.V., Georgiyev G.P., Larin S.S. Inhibitory receptors of lymphocytes and their role in antitumor immunity. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2007, Vol. 53, no. 2, pp. 140-149. (In Russ.)]

8. Bae D.S., Hwang Y.K., Lee J.K. Importance of NKG2D NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell. *Cellular Immunology*, 2012, Vol. 276, pp. 122-127.

9. Doubrovina E.S., Doubrovin M.M., Vider E., Sisson R.B., O'Reilly R.J., Dupont B., Vyas Y.M. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 12, pp. 6891-6899.

10. El-Gazzar A., Groh V., Spies T. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *Immunology*, 2013, Vol. 191, pp. 1509-1515.

11. Fernandez L., Portugal R., Valentin J., Martín R., Maxwell H., González-Vicent M., Ángel Díaz M., de Prada I., Pérez-Martínez A. *In vitro* natural killer cell immunotherapy for medulloblastoma. *Frontiers in Oncology*, 2013, Vol. 3, Art. 94.

12. Groh V., Wu J., Yee C., Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 2002, Vol. 419, pp. 734-738.
13. Krieg S., Ullrich E. Novel immune modulators used in hematology: impact on NK cells. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 3, Art. 388.
14. Martin G.S. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell.*, 2003, Vol. 4, pp. 167-174.
15. Pardoll D. Immunology. Stress, NK Receptors, and Immune Surveillance. *Science*, 2001, Vol. 294, pp. 534-538.

Авторы:

Абакушина Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

Лысюк Е.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной терапии ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Посвятенко А.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории генной терапии ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии Научно-исследовательского института трансляционной медицины ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кибардин А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной терапии ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Abakushina E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Lyssuk E. Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Gene Therapy, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Posvyatenko A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Gene Therapy, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Research Associate, Laboratory of Molecular Oncology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Kibardin A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Gene Therapy, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Поступила 19.10.2016
Принята к печати 20.10.2016

Received 19.10.2016
Accepted 20.10.2016