

## **ЦИРКУЛИРУЮЩИЙ БЕЛОК МІСА У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЛИМФОМАМИ**

**Клиноква А.В.<sup>1</sup>, Кузьмина Е.Г.<sup>2</sup>, Абакушина Е.В.<sup>2</sup>, Каневский Л.М.<sup>1</sup>,  
Неприна Г.С.<sup>2</sup>, Павлов В.В.<sup>2</sup>, Коваленко Е.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

**Резюме.** Белок МІСА — это стресс-индуцированный белок, который, как правило, не экспрессируется в здоровых тканях, однако появляется в большом количестве на поверхности клеток, подвергшихся опухолевой трансформации. В организме человека этот белок может как инициировать противоопухолевый иммунный ответ, так и способствовать ускользанию опухолевых клеток от уничтожения. В результате сбрасывания с поверхности опухолевых клеток растворимый белок МІСА попадает в циркуляцию и способствует снижению активности эффекторных клеток за счет инактивации рецептора NKG2D. В данном исследовании была поставлена задача определить различия в концентрации циркулирующего белка sMICA в сыворотке крови больных разными типами злокачественных лимфом и оценить влияние sMICA на NKG2D-позитивные цитотоксические лимфоциты. В экспериментальной модели с использованием клеточной линии C1R-MICA показан феномен сбрасывания МІСА с поверхности культивируемых опухолевых клеток во внеклеточное пространство и продемонстрировано с помощью проточной цитометрии снижение экспрессии в мононуклеарах периферической крови рецептора NKG2D, зависимое от содержания sMICA в культуральной среде, что предполагает участие сывороточных молекул sMICA в супрессии противоопухолевого иммунного ответа. С помощью иммуноферментного метода проведен анализ содержания циркулирующего белка sMICA у больных с различными типами В-клеточных и Т-клеточной неходжкинскими лимфомами и выявлены группы пациентов с повышенным, по сравнению с контрольной группой, содержанием циркулирующего sMICA. Минимальное количество сывороточного sMICA было зарегистрировано в контрольной группе с медианой 20 пг/мл. В объединенной группе больных различными В-клеточными лимфомами было выявлено увеличение концентрации циркулирующего белка МІСА более чем в 6,5 раз по сравнению с контрольной группой. При этом наиболее высокие значения sMICA были зарегистрированы в группах пациентов с хроническим лимфолейкозом, диффузной В-крупноклеточной лимфомой и множественной миеломой. Максимальное увеличение уровня растворимого белка sMICA среди исследованных групп больных наблюдалось в группе больных Т-клеточной анапластической лимфомой (медиана 574 пг/мл). В исследовании получены предварительные данные, свидетельствующие о супрессирующем влиянии разных компонентов (иммуно)полихимиотерапии, в част-

**Адрес для переписки:**

Коваленко Елена Ивановна  
ФГБУН «Институт биоорганической химии  
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН  
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.  
Тел./факс: 8 (495) 330-40-11.  
E-mail: lenkovalen@mail.ru

**Address for correspondence:**

Kovalenko Elena I.  
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences  
117997, Russian Federation, Moscow,  
Miklukho-Maklaya str., 16/10.  
Phone/Fax: 7 (495) 330-40-11.  
E-mail: lenkovalen@mail.ru

**Образец цитирования:**

А.В. Клиноква, Е.Г. Кузьмина, Е.В. Абакушина,  
Л.М. Каневский, Г.С. Неприна, В.В. Павлов,  
Е.И. Коваленко, «Циркулирующий белок МІСА  
у больных злокачественными лимфомами»  
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2.  
С. 151-162. doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-151-162

© Клиноква А.В. и соавт., 2016

**For citation:**

A.V. Klinkova, E.G. Kuzmina, E.V. Abakushina, L.M. Kanevskiy,  
G.S. Neprina, V.V. Pavlov, E.I. Kovalenko, "Circulating  
MICA protein in patients with malignant lymphomas", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18,  
no. 2, pp. 151-162. doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-151-162

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-151-162>

ности ритуксимаба и лучевой терапии лимфом на уровень сывороточного sMICA. Таким образом, повышенный уровень sMICA у онкогематологических больных может явиться дополнительным основанием для применения противоопухолевой терапии, а мониторинг уровня sMICA на разных этапах лечения может оказаться полезен для оценки ее эффективности.

*Ключевые слова:* злокачественные лимфомы, лимфопролиферативные заболевания, белок MICA, sMICA, цитотоксические лимфоциты, рецептор NKG2D

## CIRCULATING MICA PROTEIN IN PATIENTS WITH MALIGNANT LYMPHOMAS

Klinkova A.V.<sup>a</sup>, Kuzmina E.G.<sup>b</sup>, Abakushina E.V.<sup>b</sup>, Kanevskiy L.M.<sup>a</sup>, Neprina G.S.<sup>b</sup>, Pavlov V.V.<sup>b</sup>, Kovalenko E.I.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

**Abstract.** MICA is a stress-induced protein that, as a rule, is not expressed in healthy tissues, but appears in large amounts on the surface of cells undergoing malignant transformation. In humans, this protein can either initiate antitumor immune response, or facilitate tumor cells for their escape of destruction. After shedding from tumor cell surface, soluble MICA enters blood circulation and contributes to decreased activity of effector cells, due to inactivation of NKG2D receptor. The aim of our study was to determine differences in circulating sMICA concentrations in sera of patients with different types of malignant lymphomas, and to evaluate the impact of sMICA upon NKG2D-positive cytotoxic lymphocytes. In experimental models with C1R-MICA cells, the MICA shedding was shown to occur from the surface of cultured tumor cells into the extracellular space. A reduced NKG2D expression dependent on sMICA concentration in the culture medium was demonstrated by flow cytometry in peripheral mononuclear cells, thus suggesting a role of serum sMICA in suppression of antitumor immune response. The sMICA detection was performed in patients with various types of B- or T-cell non-Hodgkin's lymphomas by means of enzyme-linked immunosorbent assay. The groups of patients with increased sMICA content were identified and compared with the control group. Minimal amounts of serum sMICA were registered in the control group, with the median of 20 pg/ml. In a combined group of patients with various B-cell lymphomas, an increase in circulating sMICA amounts was shown, at the levels of more than 6.5 times exceeding the control values. The highest values of sMICA were recorded among the patients with chronic lymphocytic leukemia, diffuse large cell lymphoma, and multiple myeloma. Maximal sMICA levels among the investigated groups of patients were observed in the group of patients with T-cell anaplastic lymphoma (median of 574 pg/ml). The study provides preliminary evidence for a suppressive effect of different (immuno)chemotherapy components, in particular, rituximab and radiation therapy, upon serum sMICA contents in the lymphoma patients. Thus, elevated serum sMICA levels in patients with hematological malignancies may be considered as an additional criterion for application of the antitumor therapy. sMICA monitoring at different stages of cytostatic treatment may be useful in order to evaluate its efficiency.

*Keywords:* malignant lymphomas, lymphoproliferative diseases, MICA protein, sMICA, cytotoxic lymphocytes, NKG2D receptor

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-32342.

Список сокращений

Типы лимфом: БЛ – беркиттоподобная лимфома; ДБККЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома; ММ – множественная миелома; ТАЛ – Т-клеточная анапластическая лимфома; ФЛ – фолликулярная лимфома; ХЛЛ – хронический лимфолейкоз.

Типы терапии: ВДХТ – высокодозная химиотерапия; ЛТ – лучевая терапия; ПХТ – полихимиотерапия.

FC – флударабин, циклофосфан; COP – циклофосфан, винкристин, преднизолон; R-FC – ритуксимаб, флударабин, циклофосфан; R-COP – ритуксимаб, циклофосфан, винкристин, преднизолон; R-CHOP – ритуксимаб, циклофосфан, доксорубин, винкристин, преднизолон; FMC – флударабин, митоксантрон, циклофосфан; CO – циклофосфан, винкристин.

## Введение

Иммунная система участвует в распознавании и уничтожении поврежденных, в том числе опухолевых, клеток в организме. В свою очередь, опухолевые клетки используют многочисленные механизмы ухода от иммунного надзора. Показано, что белок MICA (MHC-I class-related protein A) обладает обеими возможностями: может служить инициатором противоопухолевого иммунного ответа, а также способствовать ускользанию опухолевых клеток от уничтожения [7]. Этот белок, как правило, не экспрессируется в здоровых тканях, однако появляется в большом количестве на поверхности пролиферирующих клеток, подвергшихся опухолевой трансформации [12, 13, 14].

Гликопротеин MICA с молекулярной массой около 43 кДа сходен по строению с белками главного комплекса гистосовместимости класса I: состоит из одной  $\alpha$ -цепи с тремя внеклеточными доменами  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ , трансмембранным и цитоплазматическим участками [12, 21], однако не способен связывать  $\beta 2$ -микроглобулин. Белок MICA кодируется высокополиморфным геном [6], для которого в настоящее время известно более 80 аллельных вариантов (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). Белок MICA распознается рецептором NKG2D (CD314), который экспрессируется в натуральных, или естественных, киллерах (NK-клетках), в  $CD8^+$   $\alpha\beta$  и части  $\gamma\delta$  Т-лимфоцитов [7, 13]. Мономер MICA связывается с гомодимером NKG2D, образуя комплекс [20], в результате чего в эффекторные клетки передается активирующий сигнал за счет ассоциации рецептора с адаптерным белком DAP10, содержащим активационный мотив YXXM [32]. Дальнейшая передача сигнала формирует каскад реакций, приводящий к индукции комплекса генов, связанных с цитолизом онкотрансформированных клеток-мишеней [8, 32]. Другими лигандами NKG2D у человека являются белок MICB и ряд белков семейства ULBP (UL16-binding protein), связывающих белок цитомегаловируса UL16 [8]. В NK-клетках связывание рецептора NKG2D с его лигандами достаточно для того, чтобы индуцировать активацию этих клеток, даже при наличии ингибирующих сигналов. В то же время в  $CD8^+$ Т-клетках и  $\gamma\delta$  Т-клетках такое взаимодействие оказывает только ко-стимулирующее действие [13]. Этот процесс является частью противоопухолевого иммунитета.

Показано, что для многих опухолей характерен феномен «сбрасывания» молекул MICA с поверхности клетки с образованием растворимой формы этого белка sMICA (soluble MICA) [28]. Молекулы sMICA практически отсутствуют в сы-

воротке крови здоровых людей, однако в значительных количествах обнаруживаются в образцах сыворотки крови больных со злокачественными новообразованиями солидного типа (карциномы желудочно-кишечного тракта, поджелудочной и молочной желез, печени, почек, легких, шейки матки, яичников, гипофиза, нейроblastомы, меланомы, а также с различными формами лейкозов) [5, 3, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30]. Белок sMICA способен связываться с рецептором NKG2D, экспрессируемым эффекторными клетками, что приводит к их анергии посредством уменьшения экспрессии указанных рецепторов на клеточной поверхности и осложняет иммунотерапию онкологических заболеваний [15].

Опухоли гемопоэтической и лимфоидной тканей составляют значительную долю регистрируемых в человеческой популяции онкологических заболеваний, существенную часть их составляют злокачественные лимфомы. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2008 г. в справочнике «Классификация ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей» [29] болезни лимфоидной ткани подразделяются на четыре группы: злокачественные образования лимфоидных предшественников, лимфома Ходжкина (ранее — лимфогранулематоз), зрелые В-клеточные лимфомы и зрелые Т-/NK-клеточные лимфомы. Последние две группы при объединении составляют большую группу неходжкинских лимфом.

В сыворотке крови больных с гематологическими опухолевыми заболеваниями многими исследователями регистрировалось увеличение содержания циркулирующего белка sMICA [10, 27]. Так, повышенный уровень sMICA наблюдался при различных типах лейкозов, в том числе при В-клеточном хроническом лимфолейкозе [17, 25], Т-клеточном гранулярном лимфолейкозе [31], лимфоцитоме кожи [9]. Ранее нами также был продемонстрирован повышенный уровень sMICA в сыворотке крови больных неходжкинскими лимфомами, тогда как у больных лимфомой Ходжкина (выборка из 26 человек) концентрация sMICA не отличалась от контрольных значений, зарегистрированных у практически здоровых людей [2]. В то же время не было проведено сравнительного анализа содержания sMICA у больных разными типами В-клеточных неходжкинских лимфом и у больных Т-клеточной лимфомой.

**Целью исследования** явилось изучение содержания белка sMICA в крови больных злокачественными лимфомами и его роли в ингибировании иммунного ответа. В экспериментальной модели показан феномен сбрасывания MICA с поверхности культивируемых опухолевых клеток во внеклеточное пространство и снижение

активации эффекторных клеток через рецептор NKG2D, зависящее от содержания sMICA в культуральной среде. Проведено сравнение концентраций sMICA в сыворотке крови больных с различными типами В-клеточных и с Т-клеточной неходжкинскими лимфомами, и выявлены группы пациентов с повышенным, по сравнению с контрольной группой, содержанием циркулирующего sMICA. Получены предварительные результаты по оценке действия (иммуно)полихиомо- и лучевой терапии на уровень sMICA.

## Материалы и методы

### Клеточные линии

Клеточная линия В-клеточного лейкоза человека C1R и ее клон C1R-MICA, трансфицированный плазмидой, содержащей ген *mica*, были любезно предоставлены доктором V.Groh-Spies (университет Вашингтона, Сиэтл, США). Различия в экспрессии белка MICA позволяют использовать данные клеточные линии для изучения феномена «сбрасывания» молекул MICA с поверхности опухолевых клеток с образованием растворимой формы этого белка – sMICA [28]. Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640 (ПанЭко, РФ), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 50 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин (далее полная среда) во флаконах при 37 °С в условиях повышенной влажности с 5% CO<sub>2</sub>. При культивировании линии C1R-MICA дополнительно применяли антибиотик G418 в концентрации 1,5 мг/мл. Спонтанную экспрессию MICA на поверхности клеток C1R и C1R-MICA определяли с помощью проточной цитометрии после непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания клеток с использованием моноклональных антител к MICA (R&D systems, США). Концентрацию белка sMICA в супернатантах клеток C1R и C1R-MICA, посаженных в плотности 400 тыс. клеток/мл, измеряли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) через каждые 24 ч инкубации в течение 4 суток.

### Изучение влияния растворимой формы белка sMICA на активацию эффекторных клеток

При проведении анализа влияния sMICA на поверхностную экспрессию рецептора NKG2D в мононуклеарных клетках крови здоровых людей в качестве источника sMICA использовали супернатант 4-дневной культуры C1R-MICA. Контролем служил супернатант нетрансфицированных клеток линии C1R.

Выделение периферических мононуклеаров (ПМН) из крови человека проводили по стандартной методике на градиенте плотности фикола, как описано ранее [4]. Выделенные ПМН инкубировали в полной среде в присутствии 500

ед./мл IL-2 и 4-дневной культуральной среды линий C1R либо C1R-MICA в течение 24 ч. Супернатанты добавляли к ресуспендированным в полной среде ПМН в соотношении 1:1. Анализ экспрессии рецептора NKG2D на поверхности ПМН проводили после окрашивания флуоресцентно меченными антителами к NKG2D (CD314, eBioscience, США) методом проточной цитофлуориметрии.

### Исследование концентрации sMICA в сыворотке крови: группы больных, сбор образцов

В исследование включено 79 образцов сыворотки крови первичных пациентов в возрасте старше 18 лет с гистологически верифицированным диагнозом злокачественных лимфом без признаков системной инфекции или тяжелых заболеваний сердечно-сосудистой, нервной, дыхательной или эндокринной систем. У больных не было в анамнезе других онкологических заболеваний. В исследование не включались пациенты, у которых может быть повышен уровень sMICA, в частности с положительным тестом на ВИЧ [24], а также беременные или кормящие грудью женщины. Контрольную группу составили образцы сыворотки крови практически здоровых людей. Для получения сывороток пробирки с периферической кровью центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, надосадок (0,5-1 мл) отбирали в микропробирку. Образцы сывороток замораживали и хранили при -30 °С. У всех участников исследования была проведена оценка содержания sMICA в сыворотке крови.

Анализ динамики уровня sMICA провели у шести больных зрелыми В-клеточными лимфомами в ходе лечения в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба (г. Обнинск) с применением (иммуно)химиотерапии по разным протоколам, лучевой терапии (ЛТ) или высокодозной химиотерапии (ВДХТ). Образцы сыворотки крови этих больных отбирали до и после этапа проведенного лечения.

### Метод определения sMICA

Содержание белка sMICA определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора антител (R&D Systems, США). В лунки 96-луночного планшета повышенной сорбционной емкости наносили мышинные антитела к человеческому белку sMICA в концентрации 2 мкг/мл в фосфатном буферном солевом растворе, pH 7,2 (PBS), инкубировали в течение ночи, затем трижды промывали лунки буфером для отмывки (0,05% Tween 20 в PBS). Далее вносили в лунки блокирующий буфер на основе PBS, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), и через 1 ч отмывали. В подготовленные лунки вносили предварительно разведенные в 2-4 раза сыво-

ротки крови больных или здоровых людей, супернатанты клеточных культур или стандартные образцы рекомбинантного человеческого белка sMICA, инкубировали в течение 2 ч с последующей отмывкой. В каждую лунку добавляли биотинилированные козы антитела к другому эпитопу sMICA (400 нг/мл, 1% BSA в PBS), инкубировали в течение 2 ч и промывали лунки. Затем в лунки вносили раствор конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена, инкубировали 20 мин в темноте и отмывали. Ферментативную реакцию проявляли с помощью 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в присутствии перекиси водорода и через 20 мин останавливали путем добавления в каждую лунку 2N раствора серной кислоты. Измерение оптической плотности образцов проводили при длине волны 450 нм с помощью планшетного ридера Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Концентрацию sMICA определяли с помощью калибровочной кривой. Статистический анализ данных, полученных в разных группах, проводили с помощью метода Манна–Уитни с использованием компьютерной программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США).

#### Проточная цитофлуориметрия

Уровень флуоресценции клеток оценивали на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США). В каждом образце при анализе поверхностной экспрессии антигенов измеряли не менее 10000 событий, зарегистрированных в секторе живых клеток. Кроме того, в ПМН больных методом проточной цитофлуориметрии определяли соотношение основных популяций лимфоцитов, в том числе долю клеток, экспрессирующих CD20.

Полученные данные обрабатывали с помощью программ CellQuest (BD Biosciences, США) и WinMDI (Dr. Joe Trotter, США), с использованием t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни.

## Результаты

### 1. Изучение феномена сбрасывания MICA с поверхности культивируемых опухолевых клеток

В нашем исследовании была использована модель *in vitro* для изучения механизмов влияния формы белка MICA на экспрессию активирующего рецептора NKG2D. В основу модели легло применение трансфицированной генотипом *mica* линии C1R-MICA. Уровень экспрессии белка MICA на поверхности этих клеток оказался значительно выше, чем в исходных опухолевых клетках C1R, на мембране которых белок MICA обнаруживался в небольшом количестве (рис. 1А). Полученные результаты позволили использовать трансфицированную клеточную линию C1R-MICA для изучения феномена «сбрасывания» молекул MICA с поверхности опухолевых клеток с образованием растворимой формы этого белка sMICA. С помощью иммуноферментного анализа было выявлено, что при культивировании этих клеток в среде в значительном количестве накапливается sMICA, концентрация sMICA в супернатанте культуры с 1 по 4 сутки инкубации постоянно увеличивалась и через 4 дня достигала концентраций 200–300 пг/мл (рис. 1Б).

### 2. Ингибирование экспрессии рецептора NKG2D в эффекторных клетках, зависимое от содержания sMICA в культуральной среде

Нами проведен анализ влияния sMICA на поверхностную экспрессию рецептора NKG2D

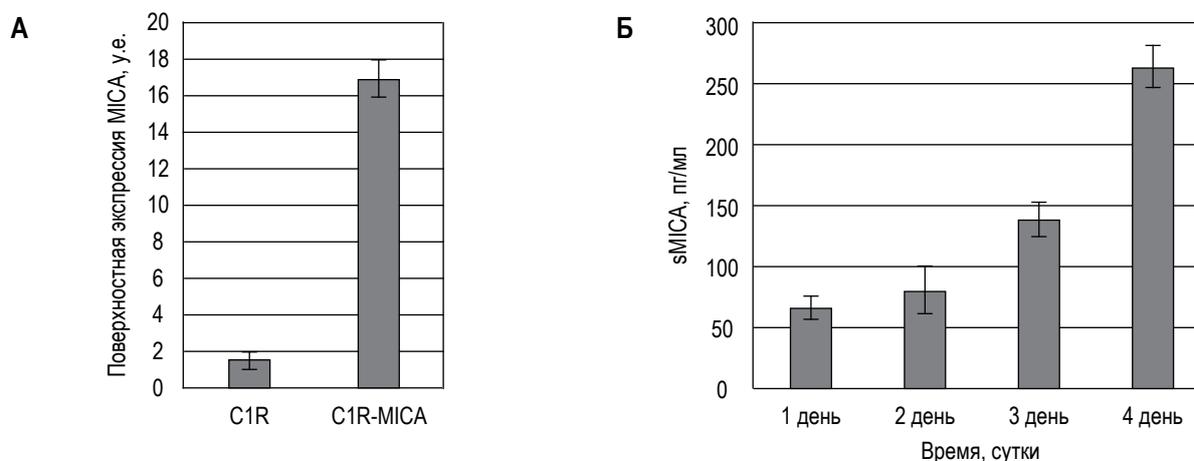


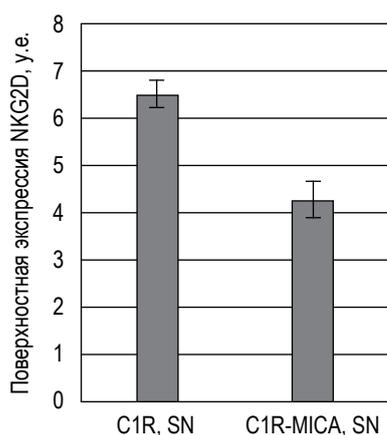
Рисунок 1. Экспрессия белка MICA в клеточных линиях C1R и C1R-MICA

Примечание. (А) Поверхностная экспрессия белка MICA на клетках C1R и C1R-MICA. (Б) Концентрация белка sMICA, накопленного в супернатанте трансфицированных опухолевых клеток C1R-MICA. На каждом из графиков представлены репрезентативные данные (среднее  $\pm$  стандартное отклонение) одного из трех независимых экспериментов, выполненных в дубляж.

в мононуклеарных клетках крови здоровых людей. В качестве источника sMICA использован супернатант 4-дневной культуры C1R-MICA, содержащий 280 пг/мл, тогда как контролем служил супернатант аналогичной культуры нетрансфицированных клеток линии C1R, содержащий, согласно проведенному ИФА, 24 пг/мл sMICA. В исследованиях других 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 рецептора NKG2D, что определяет механизм уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора [15, 28]. В данном эксперименте было установлено, что инкубация NK-клеток в присутствии IL-2 с супернатантом опухолевых клеток C1R-MICA, содержащим растворимые формы молекул MICA, уже через сутки вызывает снижение экспрессии активационного рецептора NKG2D (рис. 2).

### 3. Концентрация sMICA в сыворотках крови больных при разных формах злокачественных лимфом

Повышенный уровень sMICA в сыворотке крови больных с различными злокачественными новообразованиями был нами ранее выявлен в нескольких группах пациентов с солидными опухолями, в том числе при раке гортаноглотки, толстого кишечника и желудка, молочной железы и шейки матки [1, 2]. Также нами был проведен анализ sMICA у ряда онкогематологических больных [2]. Увеличенный уровень sMICA был



**Рисунок 2. Экспрессия рецептора NKG2D на поверхности мононуклеаров крови человека через 24 ч их инкубации с супернатантами (SN) от клеточных линий C1R и C1R-MICA при содержании в культуре 12 пг/мл и 140 пг/мл sMICA соответственно**

**Примечание.** Представлены репрезентативные данные (среднее  $\pm$  стандартное отклонение) одного из трех независимых экспериментов, выполненных в дублях.

выявлен в большой группе больных неходжкинскими лимфомами, в то время как у пациентов с болезнью Ходжкина концентрация sMICA в сыворотке крови достоверно не отличалась от таковой в группе здоровых людей. В настоящем исследовании была поставлена задача выяснить различия уровня циркулирующего белка sMICA в сыворотке крови больных разными типами злокачественных лимфом. Пациенты, обследованные в данной работе, были разделены на группы по типу лимфопролиферативного заболевания. У большей части пациентов были выявлены зрелые В-клеточные лимфомы: хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) у 20 пациентов, фолликулярная лимфома (ФЛ) у 11 пациентов, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДБККЛ) у 24 пациентов, множественная миелома (ММ) у 18 пациентов и беркиттоподобная лимфома (БЛ) у 2 пациентов. Дополнительную группу составили 4 пациента с Т-клеточной анапластической лимфомой (ТАЛ) – агрессивно протекающим заболеванием. В контрольную группу вошли 59 практически здоровых людей.

Основные полученные данные по содержанию циркулирующего белка sMICA в сыворотке крови больных лимфопролиферативными заболеваниями представлены в таблице 1 и на рисунке 3. Минимальное количество сывороточного sMICA было зарегистрировано в контрольной группе с медианой 20 пг/мл. Расчет средних значений и стандартного отклонения выявил, что показатели не соответствуют нормальному распределению, и для сопоставления групповых средних значений не может быть применен t-критерий Стьюдента. Сравнительный статистический анализ был проведен по критерию Манна–Уитни (U). Содержание sMICA в сыворотке крови больных В-клеточными лимфомами (объединенная группа: ХЛЛ, ФЛ, ДБККЛ, ММ и БЛ) было увеличено более чем в 6,5 раз по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Уровень sMICA у пациентов с Т-клеточными лимфомами не только достоверно отличался от контрольной группы, но и, несмотря на небольшое количество образцов в группе, оказался статистически значимо выше, чем у больных В-клеточными лимфомами ( $P = 0,041$ ).

При сравнительном анализе сывороточного содержания sMICA у больных разными типами неходжкинских лимфом было выявлено, что уровень sMICA во всех исследованных группах был значительно выше, чем у здоровых людей, за исключением группы пациентов с фолликулярной лимфомой, в которой отличия оказались недостоверными ( $P = 0,103$ ) (рис. 3). Концентрация sMICA в этих группах больных превышала контрольный уровень в 7-14 раз, в то же время

**ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ БЕЛКА sMICA В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ, БОЛЬНЫХ ЗРЕЛЫМИ В-КЛЕТОЧНЫМИ И Т-КЛЕТОЧНЫМИ ЛИМФОМАМИ**

Группы (n – число пациентов)	Среднее ± станд. откл., пг/мл	Медиана, пг/мл	Критерий U	Уровень значимости
Здоровые люди (n = 59)	37,3±49,8	20		
В-клеточные лимфомы (n = 75)	249,4±238,6	228	975,5	P = < 0,001
Т-клеточные лимфомы (n = 4)	526,0±265,4	574	2	P = < 0,001

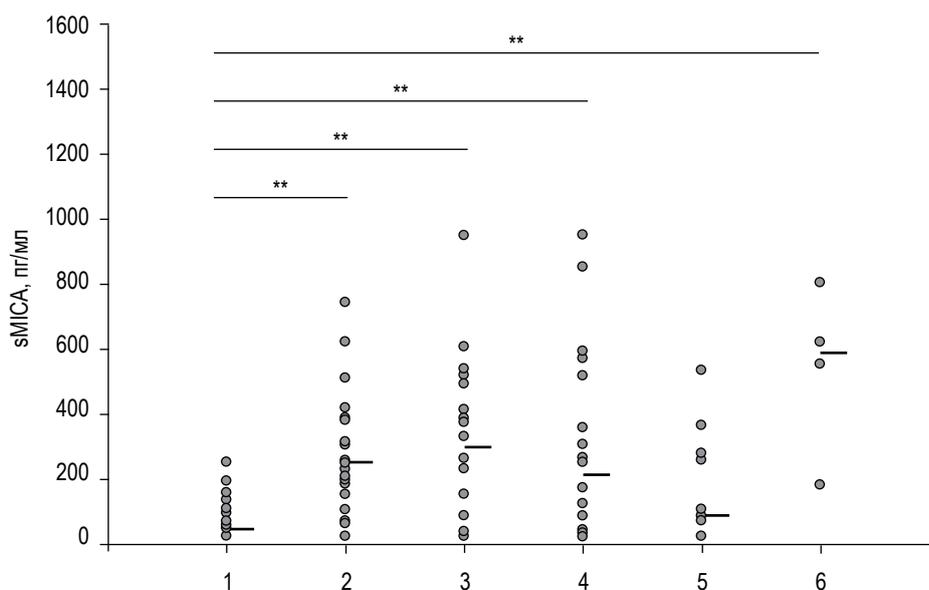
**Примечание.** U – критерий Манна–Уитни, P – уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой.

наблюдался значительный разброс концентрации sMICA между пациентами. Минимальное увеличение sMICA среди больных зрелыми В-клеточными лимфомами (медиана 64 пг/мл) было зарегистрировано в группе пациентов с ФЛ. Максимальное значение медианы значений sMICA было зарегистрировано в группе ДБККЛ (медиана 278 пг/мл), в то же время по среднему уровню значений sMICA группы ДБККЛ, ХЛЛ и ММ практически не различались (270,7; 271,8 и 272,4 пг/мл соответственно). При рассмотрении несекретирующей и Ig-секретирующей форм ММ в отдельных подгруппах были получены разные значения медиан sMICA (64 и 340 пг/мл соответственно), в то же время различия между подгруппами оказались недостоверными (P = 0,138). У пациентов группы с Т-клеточной анапластической лимфомой концентрация рас-

творимого белка sMICA многократно превышала контрольные значения, демонстрируя максимальное увеличение уровня sMICA среди исследованных групп больных (табл. 1, рис. 3). Однако необходимо еще раз отметить, что число пациентов в этой группе было небольшим, и для подтверждения полученных данных необходимы дальнейшие исследования.

#### 4. Изменение сывороточной концентрации sMICA в период лечения

Оценка динамики sMICA на этапах проводимой противоопухолевой терапии и ее сопоставление с достигнутыми результатами лечения могут дать дополнительную информацию для понимания механизмов восстановления иммунного контроля опухолей. Для того чтобы оценить, как изменяется уровень циркулирующего sMICA у больных на фоне проводимого



**Рисунок 3. Содержание sMICA в сыворотке крови пациентов**

**Примечание.** 1 – здоровые люди (контроль), 2 – ХЛЛ, 3 – ДБККЛ, 4 – ММ, 5 – ФЛ, 6 – ТАЛ. Горизонтальными черточками отмечены значения медианы, \*\* – уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой людей (P ≤ 0,001).

лечения, мы сопоставили исходную концентрацию sMICA в сыворотке крови шести больных зрелыми В-крупноклеточными лимфомами с ее уровнем после получения ими от 1 до 6 циклов химиотерапии (рис. 4) по протоколам FC (флударабин, циклофосфан), COP (циклофосфан, винкристин, преднизолон) либо иммунохимиотерапии с включением Ритуксимаба – R-FC, R-COP и R-CHOP (циклофосфан, доксорубин, винкристин, преднизолон). Один пациент получил 3 блока ВДХТ.

После проведенного лечения наблюдалась следующая динамика уровня sMICA: у четырех больных повышенная концентрация sMICA снизилась в 2,4-4,0 раза, у одного больного сохранился низкий исходный уровень этого белка и у одного – его концентрация повысилась. Пациентом, лечение которого приводило к росту концентрации sMICA в сыворотке крови, оказался больной БЛ. У данного пациента на фоне проведения трех блоков ВДХТ концентрация sMICA в сыворотке крови увеличилась в 5 раз. У четырех больных лечение включало применение Ритуксимаба, что привело к снижению доли CD20-позитивных клеток в периферической крови (в 2-820 раз, в зависимости от исходного уровня). У трех больных исходный уровень sMICA был повышенным и снизился после лечения. У одного больного с диагнозом ФЛ после проведения 4 циклов ПХТ по схеме R-COP концентрация sMICA в сыворотке крови практически не изменилась и осталась низкой (концентрация sMICA в сыворотке крови до лечения составляла 48 пг/мл, а после лечения – 68 пг/мл) (рис. 4, больной 4).

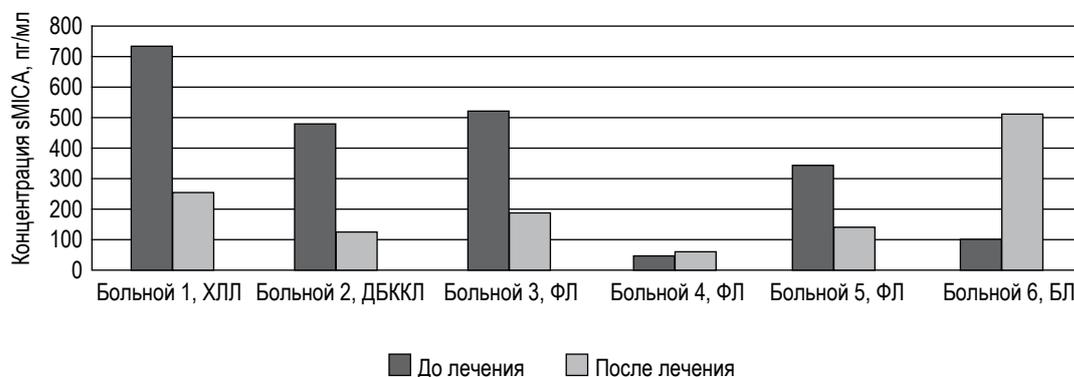
Динамика сывороточного уровня белка sMICA на протяжении более длительного времени (бо-

лее 3 лет) была прослежена у больного ХЛЛ, который за период наблюдения получил последовательно несколько циклов иммунохимиотерапии по следующим протоколам: R-FC с включением Ритуксимаба (в течение 1,5 лет), FMC с включением Кэмпаса (в течение 1 года), только Кэмпас (в течение 0,5 года) и CO (циклофосфан, винкристин) (в течение последнего месяца жизни). Результаты анализа содержания sMICA в сыворотке крови этого больного в разные периоды течения болезни и соответствующей терапии представлены на рисунке 5.

При первичном обращении у больного был зарегистрирован высокий уровень sMICA в сыворотке крови (732 пг/мл). Первый период лечения по протоколу R-FC с включением Ритуксимаба сопровождался снижением уровня sMICA при наблюдении через 1,5 года. За это время доля клеток, экспрессирующих CD20, составлявшая в ПМН до лечения 35%, снизилась до 0,3% (в 117 раз). Далее, несмотря на проводимую терапию с включением Кэмпаса, содержание sMICA в циркуляции неуклонно повышалось и через 3 года после первичного обращения достигало значений, сравнимых с начальным уровнем (616 пг/мл). Дальнейшая терапия по протоколу CO сопровождалась резким снижением уровня sMICA в сыворотке крови больного. Однако в данном случае оно не коррелировало с ремиссией заболевания.

## Обсуждение

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о повышенном содержании sMICA в сыворотке крови при злокачественных лимфомах. Наличие у больных лимфомами разных аллелей белка MICA, которые могут значительно различаться по уровню поверхностной



**Рисунок 4.** Изменение показателей уровня sMICA в сыворотке крови больных зрелыми В-клеточными лимфомами на этапах лечения по схемам

**Примечание.** 4 цикла ПХТ, R-FC (больной 1); 6 циклов R-CHOP, ЛТ (больной 2); 6 циклов COP, ЛТ (больной 3); 4 цикла ПХТ, R-COP (больной 4); 1 цикл ПХТ FC, 3 цикла R-FC (больной 5); ВДХТ, 3 блока (больной 6).

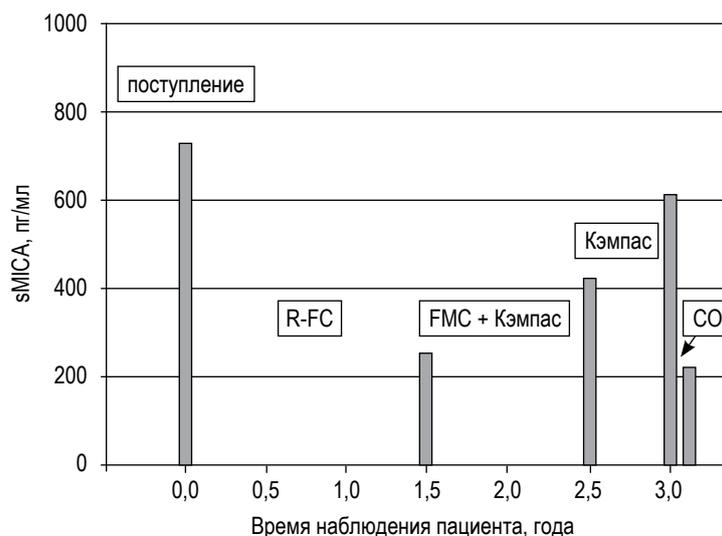


Рисунок 5. Динамика содержания sMICA в сыворотке крови больного ХЛЛ в ответ на разные схемы лечения в разные периоды течения болезни

экспрессии и образованию сывороточных форм [11], по-видимому, можно привлечь к объяснению значительного разброса в концентрациях sMICA, наблюдаемого в исследовании.

С другой стороны, в системе *ex vivo* продемонстрировано sMICA-зависимое угнетение экспрессии активирующего рецептора NKG2D на NK-клетках здоровых людей. Известно, что NK-клетки могут играть значительную роль в иммунном ответе против опухолей гематологического происхождения, возможно, за счет большей доступности этих эффекторов, по сравнению с солидными опухолями, к потенциальным клеткам-мишеням. Логично предположить, что механизмы экспрессии MICA на поверхности измененных клеток и «сбрасывание» этих молекул в кровь с образованием растворимой формы sMICA могут играть значительную роль в патогенезе гематологических злокачественных заболеваний.

Среди исследованных групп больных только в группе больных с фолликулярной лимфомой нами не было выявлено статистически значимого отличия значений уровня sMICA от контроля, хотя, возможно, при наличии большего количества образцов в группе искомый уровень достоверности мог бы быть достигнут. В группах ДБКЛ, ХЛЛ и ММ средний уровень сывороточных концентраций sMICA оказался весьма сходным.

Наблюдаемое снижение сывороточной концентрации sMICA у большей части пациентов в период лечения, наряду с уменьшением количества CD20<sup>+</sup>В-лимфоцитов после применения Ритуксимаба, может свидетельствовать об эф-

фективности проводимой терапии. Выявленное увеличение белка sMICA в сыворотке крови у больного с беркиттоподобной лимфомой в период лечения, по-видимому, связано с прогрессией заболевания, обусловленной резистентностью данной беркиттоподобной лимфомы к применяемым препаратам. С другой стороны, с учетом того, что в данном исследовании только у этого больного в курс лечения была включена высокодозная химиотерапия, представляется возможным, что такой вид терапии способствовал росту экспрессии белка MICA, индуцированной клеточным стрессом, и усилению шеддинга sMICA с поверхности опухолевых клеток. Отсутствие значимого количества циркулирующего sMICA в сыворотке крови у одного из больных фолликулярной лимфомой может быть связано с наличием у него одного из аллелей MICA, для которых нехарактерна высокая поверхностная экспрессия этого маркера либо нарушен механизм высвобождения sMICA из клетки. При длительном наблюдении динамики сывороточного уровня sMICA обнаруженное увеличение сывороточной концентрации этого белка у больного ХЛЛ на этапе лечения по протоколу FMC с включением Кэмпаса и только одним Кэмпасом после значительного его снижения при лечении по протоколу R-FC может быть связано с увеличением поверхностной экспрессии белка MICA в опухолевых клетках, вызванной прогрессией заболевания.

Очевидно, положительная или отрицательная роль белка MICA определяется балансом его активирующего действия на эффекторное звено лимфоцитов, экспрессирующих рецептор

NKG2D, и ингибирующего влияния его растворимых форм на NK-клетки и другие типы цитотоксических лимфоцитов. Повышенный сывороточный уровень sMICA можно оценивать как один из факторов развития онкогематологического заболевания. В то же время при его низком содержании прогрессия заболевания может быть обусловлена участием других факторов.

Таким образом, в экспериментальной модели нами показано, что 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.

Выполнен анализ содержания циркулирующего белка sMICA в сыворотке крови в группах больных различными типами злокачественных лимфом. Проведено сравнение полученных значений в группах больных и практически здоровых

людей. Выявлены группы пациентов, где чаще повышено содержание sMICA (ХЛЛ, ДБКЛ, ММ, ТАЛ).

Получены предварительные данные, свидетельствующие о супрессирующем влиянии разных компонентов (иммуно)химиотерапии, в частности ритуксимаба, и лучевой терапии лимфом на уровень сывороточного sMICA. Повышенный уровень этого показателя может служить дополнительным критерием развития онкогематологического заболевания. Мониторинг уровня sMICA, наблюдающегося после лечебных воздействий, создает предпосылку использования этого показателя в комплексе методов оценки эффективности проводимой терапии. Контроль уровня циркулирующего белка sMICA у онкогематологических больных может быть также использован в качестве теста, определяющего правильность подбора и эффективность применения методов специфической иммунотерапии.

## Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Неприна Г.С., Пасова И.А., Бердов Б.А., Клинкова А.В., Коваленко Е.И., Каприн А.Д. Повышение уровня цитокинов и стресс-индуцированных молекул MICA в сыворотке 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., Клинкова А.В., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Увеличение растворимых форм стресс-индуцированных молекул MICA при онкологических заболеваниях // Молекулярная медицина, 2014. № 3. С. 34-38. [Abakushina E. V., Klinkova A.V., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. Elevated levels of soluble forms of stress-induced molecule MICA in sera of patients with oncological diseases. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2014, no. 3, pp. 34-38. (In Russ.)]
3. Данилова А.Б., Данилов А.О., Фахрутдинова О.Л., Балдуева И.А., Моисеенко В.М. Иммунохимический анализ продукции MICA опухолевыми клетками *in vitro* и *in vivo* в контексте создания и применения противоопухолевых вакцин // Вопросы онкологии, 2010. Т. 56, № 5. С. 576-582 [Danilova A.B., Danilov A.O., Fakhrudinova O.L., Badueva I.A., Moiseenko V.M. Immunochemical assay of MICA production by tumor cells *in vitro* and *in vivo* as a component of antitumor vaccine development. *Voprosy onkologii = Vopr. Onkol.*, 2010, Vol. 56, no 5, pp. 576-582. (In Russ.)]
4. Коваленко Е.И., Хирова Е.В., Молотковская И.М., Овчинникова Т.В., Саблина М.А., Сапожников А.М., Хайдуков С.В., Бовин Н.В. Модификация поверхности клеток с помощью липофильных гликоконъюгатов и взаимодействие модифицированных клеток с натуральными киллерами // Биоорганическая химия, 2004. Т. 30, № 3. С. 281-292. [Kovalenko E.I., Khirova E.V., Molotkovskaya I.M., Ovchinnikova T.V., Sablina M.A., Sapozhnikov A.M., Khaidukov S.V., Bovin N.V. The modification of cell surface with lipophilic glycoconjugates and the interaction of modified cells with natural killer cells. *Bioorganicheskaya khimiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, Vol. 30, no. 3, pp. 281-292. (In Russ.)]
5. Arreygue-Garcia N.A., Daneri-Navarro A., del Toro-Arreola A., Cid-Arregui A., Gonzalez-Ramella O., Jave-Suarez L.F., Aguilar-Lemarroy A., Troyo-Sanroman R., Bravo-Cuellar A., Delgado-Rizo V., Garcia-Iglesias T., Hernandez-Flores G., del Toro-Arreola S. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*, 2008, Vol. 8, p. 16.
6. Bahram S., Spies T. The MIC gene family. *Res. Immunol.*, 1996, Vol. 147, no. 5, pp. 328-333.
7. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 1999, Vol. 285, no. 5428, pp. 727-729.

8. Cosman D., Müllberg J., Sutherland C.L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M., Chalupny N.J. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 2001, Vol. 14, no. 2, pp. 123-133.
9. Dulphy N., Berrou J., Campillo J.A., Bagot M., Bensussan A., Toubert A. NKG2D ligands expression and NKG2D-mediated NK activity in Sezary patients. *J. Invest. Dermatol.*, 2009, Vol. 129, no. 2, pp. 359-364.
10. Fang X.C., Liu H.L., Sun Z.M., Gui L., Geng L.Q., Wang X.B., Zhou M., Wang Z.Y. Expression and abscission of activated receptors and their ligands on/from NK cells in peripheral blood of patients with acute leukemia. *Zhongguo Shi. Yan. Xue. Ye. Xue. Za. Zhi.*, 2010, Vol. 18, no. 2, pp. 436-440.
11. Gonzalez S., Groh V., Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006, Vol. 298, pp.121-138.
12. Groh V., Bahram S., Bauer S., Herman A., Beauchamp M. Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, Vol. 93, pp. 12445-12450.
13. Groh V., Rhinehart R., Randolph-Habecker J., Topp M.S., Riddell S.R., Spies T. Costimulation of CD8 alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 3, pp. 255-260.
14. Bauer S., Grabstein K.H., Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, Vol. 96, no. 12, pp. 6879-6884.
15. 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, no. 6908, pp. 734-738.
16. Holdenrieder S., Stieber P., Peterfi A., Nagel D., Steinle A., Salih H.R. Soluble MICA in malignant diseases. *Int. J. Cancer*, 2006, Vol. 118, no. 3, pp. 684-687.
17. Huergo-Zapico L., Gonzalez-Rodriguez A.P., Contesti J., Gonzalez E., López-Soto A., Fernandez-Guizan A., Acebes-Huerta A., de Los Toyos J.R., Lopez-Larrea C., Groh V., Spies T., Gonzalez S. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer. Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1201-1210.
18. Jinushi M., Takehara T., Tatsumi T., Hiramatsu N., Sakamori R., Yamaguchi S., Hayashi N. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J. Hepatol.*, 2005, Vol. 43, no. 6, pp. 1013-1020.
19. Jinushi M., Vanneman M., Munshi N.C., Tai Y.T., Prabhala R.H., Ritz J., Neuberger D., Anderson K.C., Carrasco D.R., Dranoff G. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, Vol. 105, no. 4, pp. 1285-1290.
20. Li P., Morris D.L., Willcox B.E., Steinle A., Spies T., Strong R.K. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 5, pp. 443-451.
21. Li P., Willie S.T., Bauer S., Morris D.L., Spies T., Strong R.K. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity*, 1999, Vol. 10, no. 5, pp. 577-584.
22. Ma L., Li G., Su Y., He Q., Zhang C., Zhang J. The soluble major histocompatibility complex class I-related chain A protein reduced NKG2D expression on natural killer and T cells from patients with prolactinoma and non-secreting pituitary adenoma. *J. Clin. Neurosci.*, 2010, Vol. 17, no. 2, pp. 241-247.
23. Märten A., Lilienfeld-Toal M., Büchler M.W., Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *Int. J. Cancer*, 2006, Vol. 119, no. 10, pp. 2359-2365.
24. Matusali G., Tchidjou H.K., Pontrelli G., Bernardi S., D'Ettoire G., Vullo V., Buonomini A.R., Andreoni M., Santoni A., Cerboni C., Doria M. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. *FASEB J.*, 2013, Vol. 27, no. 6, pp. 2440-2450.
25. Nuckel H., Switala M., Sellmann L., Horn P.A., Durig J., Duhrsen U., Kuppers R., Grosse-Wilde H., Rebmann V. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2010, Vol. 24, no. 6, pp. 1152-1159.
26. Raffaghello L., Prigione I., Airoidi I., Camoriano M., Levreri I., Gambini C., Pende D., Steinle A., Ferrone S., Pistoia V. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia*, 2004, Vol. 6, no. 5, pp. 558-568.
27. Salih H.R., Antropius H., Gieseke F., Lutz S.Z., Kanz L., Rammensee H.G., Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 4, pp. 1389-1396.
28. Salih H.R., Rammensee H.G., Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 8, pp. 4098-4102.
29. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. The International Agency for Research on Cancer, Lyon, France: IARC Press, 2008.

30. Tamaki S., Sanefuzi N., Kawakami M., Aoki K., Imai Y., Yamanaka Y., Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., Kirita T. Association between soluble MICA levels and disease stage IV oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *Hum. Immunol.*, 2008, Vol. 69, no. 2, pp. 88-93.
31. Viny A.D., Clemente M.J., Jasek M., Askar M., Ishwaran H., Nowacki A., Zhang A., Maciejewski J.P. MICA polymorphism identified by whole genome array associated with NKG2D-mediated cytotoxicity in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Haematologica*, 2010, Vol. 95, no. 10, pp. 1713-1721.
32. Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., Phillips J.H. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 1999, Vol. 285, no. 5428, pp. 730-732.

---

**Авторы:**

**Клинова А.В.** — младший научный сотрудник, лаборатория клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

**Кузьмина Е.Г.** — к.б.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

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

**Каневский Л.М.** — к.б.н., научный сотрудник, лаборатория клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

**Неприн Г.С.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

**Павлов В.В.** — к.м.н., заведующий отделением лучевой и лекарственной терапии гемобластозов, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

**Коваленко Е.И.** — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

**Authors:**

**Klinkova A.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

**Kuzmina E.G.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

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

**Kanevskiy L.M.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

**Neprina G.S.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

**Pavlov V.V.**, PhD (Medicine), Head, Department of Radiation and Drug Therapy of Leukemia, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

**Kovalenko E.I.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 12.10.2015  
Принята к печати 07.12.2015

Received 12.10.2015  
Accepted 07.12.2015