

УДК: 571.27:57.083

Original Article

ВЛИЯНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ TREG-КЛЕТОК НА ЭКСПРЕССИЮ HLA-E ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА И В-КЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА

Кан С.А.^{*1,2,4}, Лушова А.В.^{1,2,4}, Тлеулиева Р.Т.¹, Абдолла Н.^{1,2}, Толендиева А.¹, Перфильева Ю.В.^{1,2}, Остапчук Е.О.^{1,2,3}

¹ РГП на ПХВ «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», ул. Досмухамедова 86, 050012, Алматы, Республика Казахстан;

² Филиал ТОО «Национальный центр биотехнологии» в г. Алматы, ул. Жахангер 14, Алматы, 050054, Казахстан

³ ТОО «ЭКО Консалтинг», ул. Абая 143/93, Алматы, 040907, Республика Казахстан

⁴ НАО «Казахский национальный университет им. аль-Фараби», Алматы, Республика Казахстан

(E-mail: kan.soofiya@gmail.com, anzhelika.lushova@gmail.com, tleulieva@mail.ru, nurshat777@mail.ru, amina.tolendiyeva@mail.ru, ulya2005@mail.ru, ktyostapchuk@gmail.com)

*Автор-корреспондент: kan.soofiya@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Современные исследования в области онкоиммунологии традиционно рассматривают Т-регуляторные клетки как ключевых супрессоров противоопухолевого иммунного ответа за счёт их прямого воздействия на эффекторные популяции – натуральные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты. Однако влияние Т-регуляторных клеток непосредственно на биологические и иммуносупрессорные свойства самих опухолевых клеток остаётся недостаточно изученным. Гемобластозы, включая хронический миелолейкоз и лимфому Беркитта, относятся к числу злокачественных новообразований системы кроветворения с крайне неблагоприятным прогнозом при прогрессии, во многом обусловленным способностью опухоли формировать иммунопривилегированное микроокружение. В данной работе исследовано влияние естественных (nTreg) и индуцированных (iTreg) Т-регуляторных клеток на экспрессию иммуносупрессорных молекул опухолевыми клетками линий хронического миелолейкоза K562 и В-клеточной лимфомы Беркитта Raji *in vitro*. Клетки K562 и Raji культивировали совместно с субпопуляциями Treg-клеток, либо в их культуральных супернатантах, после чего экспрессию иммуносупрессорных молекул анализировали методом проточной цитометрии. Показано, что прямое контактное взаимодействие опухолевых клеток с nTreg- и iTreg-клетками приводит к статистически достоверному повышению экспрессии молекулы HLA-E на поверхности обеих исследуемых линий. Полученные данные свидетельствуют о том, что Т-регуляторные клетки способны модифицировать иммунофенотип опухолевых клеток, усиливая их способность к ускользанию от иммунного надзора. Таким образом, результаты работы расширяют существующие представления о роли Т-регуляторных клеток в прогрессии гемобластозов и подчёркивают необходимость учёта их прямого влияния на опухолевые клетки при разработке новых иммунотерапевтических подходов.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, иммуносупрессорные маркеры, хронический миелолейкоз, В-клеточная лимфома Беркитта, HLA-E;

ВВЕДЕНИЕ

Современная концепция развития гемобластозов, включая хронический миелолейкоз и лимфому Беркитта, рассматривает прогрессию заболевания не только как результат генетической нестабильности клетки, но и как следствие формирования специализированного иммунопривилегированного микроокружения. Важнейшую роль в этом процессе играют Т-регуляторные (Treg) клетки, которые подавляют противоопухолевый иммунный ответ, создают толерогенное микроокружение и, тем самым, способствуют прогрессии злокачественных новообразований [1].

Treg-клетки представляют собой гетерогенную популяцию, которую условно подразделяют на естественные (nTreg) и индуцированные (iTreg) клетки. Обе субпопуляции демонстрируют выраженные иммуносупрессорные свойства как *in vitro*, так и *in vivo*. nTreg-клетки формируются в тимусе в процессе созревания Т-лимфоцитов и после выхода в периферическую циркуляцию обеспечивают поддержание периферической иммунологической толерантности. Обычно, эти клетки идентифицируют в периферической крови и вторичных лимфоидных органах по стабильной экспрессии маркеров CD4, CD25 и транскрип-

ционного фактора Foxp3. В свою очередь, iTreg-клетки представляют собой неоднородную группу, формирующуюся из наивных CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Т-клеток (Tcon) на периферии под действием при антигенной стимуляции Т-клеточных рецепторов (TCR) Tcon-клеток в присутствии трансформирующего фактора роста β (TGF-β) и интерлейкина 2 (IL-2) [2]. Одной из наиболее изученных субпопуляций являются CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTreg-клетки, сходные по фенотипу и функциональной активности с nTreg-клетками. Их развитие отмечено, формирование данной субпопуляции *in vivo* было описано при хроническом воспалении, аутоиммунных и аллергических процессах, а также в опухолевом и трансплантационном контексте [3].

Традиционно механизмы Treg- опосредованной супрессии изучаются в контексте их прямого ингибирующего воздействия на эффекторные клетки, прежде всего естественные киллерные (NK) клетки и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL). Действительно, для гемобластозов описано иммуносупрессорное микроокружение, в котором цитокины и другие факторы подавляют функциональную активность CTL и NK-клеток, а по мере прогрессии заболевания уменьшаются как количество NK-клеток, так и их функциональная способность, что ассоциировано с

неблагоприятным прогнозом заболевания [4]. При этом у пациентов с гемобластомами повышенное содержание Treg в периферической крови и костном мозге достоверно коррелирует со стадией заболевания и неблагоприятным прогнозом, а экспериментальная элиминация Treg-клеток снижает пролиферацию, ангиогенез и метастазирование опухолей [5]. Однако в последние годы акцент исследований смещается в сторону изучения «перекрестного диалога», в ходе которого Treg-клетки могут выступать активными модуляторами биологических свойств самих неопластических клеток [6].

Критическим механизмом уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора является формирование специфического иммунофенотипа, характеризующегося нарушением баланса между активационными и ингибиторными сигналами. С одной стороны, этот процесс включает снижение экспрессии лигандов к активирующему рецептору NKG2D, таких как белки семейства ULBP-1, 2/5/6, 3 и молекулы MICA/B, что ограничивает распознавание опухолевых мишеней клетками-эффекторами. С другой стороны, наблюдается индукция неклассических молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ), в частности HLA-E и HLA-G, а также нектин-подобных белков, таких как CD112. Указанные молекулы выступают в роли ключевых лигандов для ингибирующих рецепторных комплексов, в частности, CD94/NKG2A и TIGIT, на поверхности цитотоксических лимфоцитов. Активация этих ингибиторных осей приводит к подавлению гранулярного экзцитоза эффекторов и формированию состояния стойкой иммунологической толерантности, позволяя клеткам гемобластозов эффективно избегать лизиса [7-9]. Однако влияние Treg-клеток на канцерогенные свойства клеток гемобластозов, включая экспрессию иммуносупрессорных молекул, остаётся недостаточно изученным. Мы предполагаем, что молекулы, экспрессируемые Treg-клетками, могут усиливать злокачественный потенциал клеток K562 и Raji, способствуя активации сигнальных путей, связанных с иммунным уклонением опухоли.

Мы предположили, что прямое межклеточное взаимодействие Treg-клеток с опухолевыми клетками гемобластозов способно индуцировать повышение экспрессии иммуносупрессорных молекул, усиливая тем самым потенциал опухоли к уклонению от иммунного надзора. В настоящей работе была проведена сравнительная оценка влияния nTreg- и iTreg-клеток на экспрессию иммуносупрессорных молекул клетками линий K562 и Raji в условиях прямого ко-культивирования и при воздействии культуральных супернатантов *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы венозной крови

В экспериментах использовали образцы венозной крови, полученной от добровольцев-доноров (ср. возраст 30,3±5,9 лет, n=21; женщины: ср. возраст 28,6±6,5 лет, n=9; мужчины: ср. возраст 31,5±5,5 лет, n=12), не имеющих злокачественных новообразований или явных признаков других заболеваний. Исследование было одобрено локальной этической комиссией Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина (выписка из

протокола заседания №1 от 17.05.2024г.). Все доноры дали информированное согласие, исследование проводилось согласно этическим принципам Хельсинской Декларации.

Линии опухолевых клеток

В исследовании использовали клеточную линию хронического миелолейкоза человека (K562) и В-лимфобластоидную клеточную линию человека (Raji), приобретённые в American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Культура опухолевых клеточных линий

Клетки K562 и Raji ресуспендировали в 4–5 мл полной культуральной среды (ПКС) на основе среды RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 2 mM глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина/пенициллина (Sigma-Aldrich, США), и культивировали при 37 °C и 5% CO₂ при конечной концентрации 2×10⁶ клеток в 1 мл.

Выделение мононуклеарной фракции клеток из крови

Для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК), периферическую кровь собирали натошак из локтевой вены в объеме 10–25 мл в стерильные пробирки с антикоагулянтом EDTA (BD Biosciences, США). 10 мл цельной крови наслаивали на 10 мл гистопака 1077 (Sigma-Aldrich, США), центрифугировали 20 мин при 3000g при 4°C. Интерфазные клетки мононуклеарного кольца отмывали 20-кратным объемом среды RPMI-1640 при 200g в течение 15 мин при 20°C.

Выделение nTreg-клеток

Наивные CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ nTreg- и CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ Tcon-клетки выделяли из PBMC методом иммуномагнитной сепарации с использованием набора “CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (human)”, колонок LS⁺ и MS⁺ и магнитного сепаратора VarioMACS (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу производителя. Чистота полученных фракций nTreg и Tcon превышала 90% по данным проточной цитометрии.

Для экспансии и стимуляции nTreg-клеток изолированные CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ лимфоциты стимулировали в течение 3 суток в присутствии CytoStim и TSI (Miltenyi Biotec, Германия), а также IL-2 (0,3 нг/мл) (Miltenyi Biotec, Германия).

Генерация CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTreg клеток *in vitro*

Генерацию CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTreg-клеток *in vitro* проводили согласно ранее описанной методике [10]. Для этого свежely выделенные наивные CD4⁺CD25⁺ Tcon-клетки культивировали в ПКС в 96-луночных планшетах при конечной концентрации 2×10⁵ клеток на лунку в течение 7 суток. На 1-й и 3-й дни культивирования добавляли TSI (Miltenyi Biotec, Германия) в соотношении клетки:бусы 1:1, IL-2 (5 нг/мл), TGF-β (5 нг/мл) и IL-10 (20 нг/мл) (ThermoFisher Scientific, США). На 5-й день дополнительно вносили IL-2 (5 нг/мл). После 7 суток культивирования клетки отмывали PBS и использовали в экспериментах с опухолевыми клетками.

Оценка влияния Treg-клеток на активность опухолевых клеток

Для изучения межклеточного взаимодействия nTreg- и iTreg-клеток с опухолевыми клетками субпопуляции

Treg-клеток ко-культивировали с клетками K562 или Raji в 96-луночных планшетах с круглым дном при конечной концентрации 2×10^5 клеток на лунку в течение 3 суток в соотношении 1:1. Для изучения влияния секретируемых Treg-клетками молекул клетки K562 или Raji культивировали в культуральных супернатантах, полученных от соответствующих субпопуляций Treg-клеток, дополненных 10% FBS, при тех же условиях. Контролем служили культуры опухолевых клеток, культивируемые без добавления nTreg- или iTreg-клеток или их супернатантов.

Проточная цитометрия

Опухолевые клетки аспирировали, отмывали и инкубировали с флуорохром-конъюгированными моноклональными антителами к поверхностным маркерам согласно протоколам производителя. После этого клетки анализировали методом проточной цитометрии на приборе FACSCalibur с использованием программного обеспечения CellQuest Pro (BD Biosciences). При оценке фенотипа опухолевых клеток перед окрашиванием клетки инкубировали с коктейлем антител anti-CD32/anti-CD16 (ThermoFisher Scientific, США) для блокирования Fc-рецепторов. Гейтинг опухолевых клеток осуществляли по каналам FSC и SSC.

Для проточной цитометрии использовали следующие античеловеческие моноклональные антитела: anti-HLA-E-APC, CD4-PerCP, CD25-PE, FoxP3-APC (Miltenyi Biotec, Германия); HLA-A,B,C,-PE (BD Pharmingen, США); ULBP1-PerCP, ULBP3-PE, ULBP2/5/6-PE (R&D Systems, США); MICA/MICB-PE, HLA-G-APC, CD112-PE (Biolegend, США).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Prism 8 (GraphPad). Данные представлены в виде средних значений (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD) либо в виде медиан с указанием отдельных значений для каждого образца. Для оценки статистической значимости различий использовали t-критерий Стьюдента; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Субпопуляции Treg-клеток повышают экспрессию иммуносупрессорной молекулы HLA-E клетками опухолевых линий K562 и Raji

Для изучения влияния Treg-клеток контактным способом на экспрессию иммуносупрессорных молекул и устойчивость к противоопухолевому иммунному ответу, стимулированные *in vitro* nTreg-клетки и полученные *in vitro* CD4+CD25+Foxp3+ iTreg-клетки ко-культивировали с клетками опухолевых линий K562 или Raji в течение трех дней в соотношении 1:1. Для изучения влияния растворимых факторов, продуцируемых nTreg-, CD4+CD25+Foxp3+ iTreg- и Tr1-клетками, K562- и Raji-клетки инкубировали в супернатантах, полученных от данных субпопуляций Treg-клеток. После этого анализировали долю клеток, экспрессирующих факторы, участвующие в устойчивости к противоопухолевому иммунному ответу, включая лиганды активирующего рецептора цитотоксических клеток NKG2D – ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3, MHC-I-связанные белки A и B (MHC-I chain-

related protein A and B, MICA/B) и лиганды к ингибирующим рецепторам (HLA-E, HLA-G и CD112) цитотоксических иммунных клеток K562- и Raji-клетками после их инкубации в присутствии nTreg- и CD4+CD25+Foxp3+ iTreg-клеток или их супернатантов.

При анализе воздействия nTreg-клеток было установлено, что прямое межклеточное ко-культивирование приводит к статистически значимому увеличению доли HLA-E-позитивных клеток в обеих исследуемых линиях. В то время как инкубация клеток K562 и Raji в присутствии супернатантов, полученных от nTreg-клеток, не вызывала достоверного изменения уровня экспрессии HLA-E (Рисунок 1a). Это подтверждает, что индукция данной иммуносупрессорной молекулы опосредована преимущественно механизмами прямого клеточного контакта, а не секретируемыми гуморальными факторами.

Аналогичная закономерность была выявлена при изучении влияния CD4+CD25+Foxp3+ iTreg-клеток. Прямой контакт с iTreg-клетками инициировал существенное увеличение количества HLA-E⁺ опухолевых клеток линий K562 и Raji (Рисунок 1b), что указывает на приобретение ими иммунопривилегированного статуса. Однако, как и при ко-культивировании с nTreg-клетками, воздействие супернатантов iTreg-клеток не оказывало статистически значимого влияния на изменение экспрессии HLA-E. Примечательно, что ни одна из исследованных моделей (контактная и дистанционная) не приводила к достоверным изменениям уровней других маркеров, включая ULBP1–3, MICA/B, HLA-G и CD112.

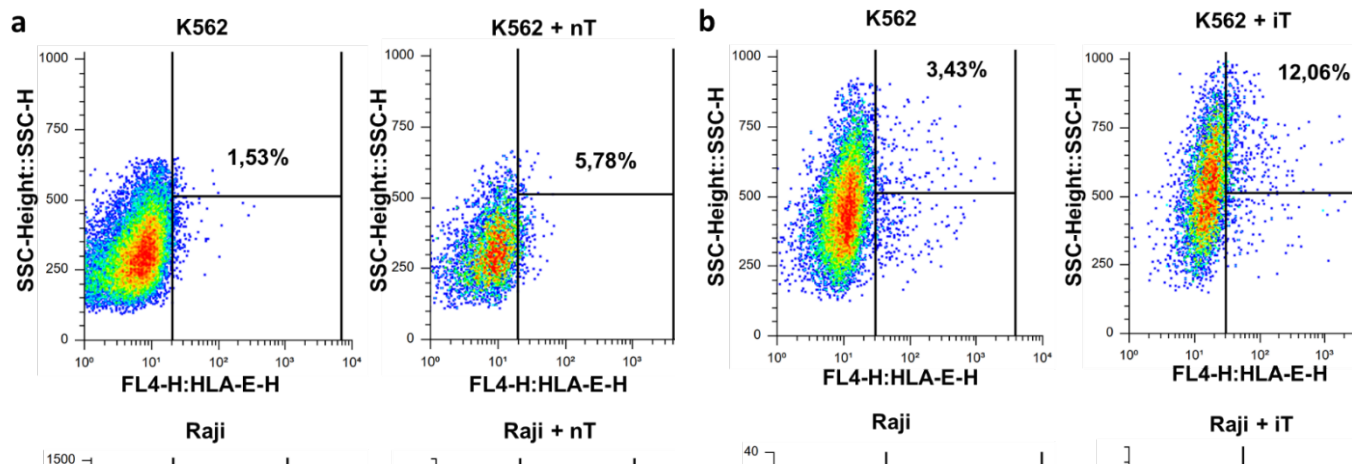
При этом ни прямое ко-культивирование с nTreg- и iTreg-клетками, ни воздействие их культуральных супернатантов не оказывали достоверного влияния на уровень поверхностной экспрессии других исследованных молекул на клетках линий K562 и Raji, включая ULBP1–3, MICA/B, HLA-G и CD112 (данные не представлены).

Представлены репрезентативные и обобщенные данные в виде $M \pm SD$, достоверность различий между группами представлена как * $p < 0,01$, ** $p < 0,005$ (по критерию Стьюдента).

Рисунок 1 – Доля HLA-E⁺ K562 клеток (a) и доля HLA-E⁺ Raji (b) клеток в контроле (Контроль), после ко-культивирования в присутствии nTreg- (+nTreg) или iTreg-клетками - (+iTreg), а также после культивирования в присутствии супернатантов nTreg- (+SnTreg) или iTreg-клеток (+SiTreg)

Сравнительный анализ данных показал отсутствие статистически значимых различий во влиянии nTreg- и iTreg-клеток на экспрессию HLA-E опухолевыми клетками. Обе субпопуляции проявляли сопоставимую способность к индукции иммуносупрессорного фенотипа при непосредственном контакте с клетками K562 и Raji, что подчеркивает универсальность задействованного механизма модуляции иммуносупрессорного фенотипа опухолевых клеток.

Таким образом, мы показали, что стимулированные *in vitro* nTreg-клетки и генерированные *in vitro* CD4+CD25+Foxp3+ iTreg-клетки обладают стимулирующей



щим влиянием на канцерогенные свойства K562 и Raji клеток, активируя ими экспрессию иммуносупрессорной молекулы HLA-E. Такое же влияние опухоль-инфильтрирующие субпопуляции Treg-клеток могут оказывать и при гематобластозах у пациентов и способствовать ускользанию опухоли от иммунного ответа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гематологические новообразования, такие как хронический миелолейкоз и лимфома Беркитта, характеризуются уникальной динамикой взаимодействия с иммунной системой, поскольку опухолевые клетки и Treg-клетки ко-локализуются в одних и тех же анатомических нишах – костном мозге и лимфоидных органах. Особенностью функционирования Treg-клеток при гематобластозах является их аномально высокая рекрутизация через ось CCL22-CCR4 и последующая метаболическая адаптация к условиям гипоксии и высокого содержания лактата, что усиливает их супрессорную активность по сравнению с Treg-клетками в солидных опухолях [11-13]. Центральным наблюдением проведенного анализа является статистически значимое повышение количества клеток экспрессирующих неклассическую молекулу ГКГ I класса – HLA-E, на клетках линий K562 и Raji, происходящая строго в условиях прямого межклеточного контакта с nTreg- и iTreg-клетками.

Молекула HLA-E представляет собой неклассический антиген ГКГ I класса (Ib), обладающий низкой степенью полиморфизма и уникальной способностью презентовать консервативные нонапептиды, производные от сигнальных последовательностей классических HLA-A, -B, -C [14]. Ключевым механизмом иммуносупрессии, реализуемым через HLA-E, является его высокоаффинное взаимодействие с гетеродимерным рецепторным комплексом CD94/NKG2A, экспрессируемым на поверхности большинства NK-клеток и субпопуляции антиген-специфических CTL [15]. Данный рецептор содержит в своей цитоплазматической части ингибиторные мотивы ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs). При связывании HLA-E с CD94/NKG2A происходит фосфорилирование ITIM-мотивов, что ведет к рекрутированию и активации тирозинфосфатаз SHP-1 и SHP-2. Эти фосфатазы дефосфорилируют ключевые компоненты активационных каскадов, такие как ZAP70, SYK и PLC γ , что блокирует мобилизацию внутриклеточного кальция, подавляет де-

грануляцию перфоринов/гранзимов и останавливает секрецию про-воспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α . Данный процесс фактически парализует литическую активность эффекторов и переводит их в состояние функционального истощения. [16, 17].

Значимость гиперэкспрессии HLA-E как стратегии иммунного ускользания подтверждается клиническими данными *in vivo*. Повышение уровня HLA-E было задокументировано при различных типах гемобластозов, включая В-клеточный хронический лимфолейкоз, где это способствовало подавлению NK-опосредованного цитолиза [18]. Исследования показывают, что экспрессия этой молекулы часто сопряжена с накоплением Treg-клеток, формируя синергичный иммуносупрессивный фенотип. Так, Reimers et al. (2014) продемонстрировали, что при колоректальном раке высокая экспрессия HLA-E и накопление Treg-клеток коррелируют с ухудшением клинического исхода и являются негативными прогностическими факторами [19]. Кроме того, было показано, что HLA-E активно способствует защите опухолевых клеток от лизиса натуральными киллерами при различных типах карцином [8].

Отсутствие модуляции HLA-E при воздействии супернатантов в нашем исследовании позволяет исключить преимущественную роль растворимых цитокинов и сфокусировать внимание на контакт-зависимых сигнальных путях. При этом сопоставимая эффективность nTreg- и iTreg-клеток в индукции HLA-E может указывать на консервативность задействованных механизмов, общих для обеих субпопуляций регуляторных клеток, вероятно, связанных с мембраносвязанным TGF- β или Notch-сигналингом, способными выступать прямыми активаторами транскрипции локуса HLA-E. [16, 20, 21].

Продemonстрированные изменения в иммуносупрессорном фенотипе отражают рост способности опухолевых клеток уклоняться от противоопухолевого иммунного надзора, поскольку экспрессия HLA-E обеспечивает дополнительный ингибирующий сигнал цитотоксическим лимфоцитам [21]. Для клеток линии K562, дефицитной по классическим антигенам HLA-A/B/C, индукция HLA-E может иметь критическое функциональное значение, позволяя клетке ингибировать NK-клетки через рецепторный комплекс CD94/NKG2A, нейтрализуя механизм распознавания. В случае В-клеточной лимфомы, клеток линии Raji, повышение экспрессии HLA-E может служить дополнительным ингибиторным барьером, нивелиру-

шим активность антиген-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, воздействие nTreg- и iTreg-клеток через контактный механизм формирует адаптивную устойчивость опухоли к цитолизу. Полученные нами данные о сверхэкспрессии опухолевыми клетками гемобластозов молекулы HLA-E, а также запускаемый иммуносупрессорный механизм, подчеркивает потенциальную терапевтическую важность воздействия на ось NKG2A/HLA-E. Результаты расширяют представление об основных механизмах уклонения опухолевых клеток от иммунного ответа, и роли Treg-клеток в данном процессе, а также обосновывают терапевтическую значимость разработки новых подходов к иммунотерапии гемобластозов через блокирование сигнального пути HLA-E/NKG2A.

Ограничения исследования. Данная работа имеет ряд ограничений, которые следует учитывать при интерпретации результатов. Во-первых, исследование проводилось на иммортализованных клеточных линиях *in vitro*, и выявленные закономерности требуют дальнейшей верификации на первичном клиническом материале пациентов. Во-вторых, в настоящей работе была проведена только фенотипическая оценка экспрессии молекул. Функциональная роль индуцированной молекулы HLA-E в подавлении цитотоксичности не была проверена экспериментально, что позволяет нам лишь теоретически предполагать снижение эффективности противоопухолевого ответа. Наконец, точные молекулярные механизмы, ответственные за контакт-зависимую модуляцию HLA-E, не были окончательно определены и требуют дальнейшего изучения с использованием специфических ингибиторов сигнальных путей.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.Е. – концепция и руководство работой; К.С., Л.А., Т.А. – проведение экспериментов; А.Н., Т.Р. – обсуждение результатов исследования; К.С. – написание текста; О.Е., П.Ю. – редактирование текста статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта BR27195585 «Создание новых отечественных тест-систем и поиск потенциальных биомаркеров для диагностики социально-значимых заболеваний», финансируемого Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kim J.H., Kim B.S., Lee S.K. Regulatory T cells in tumor microenvironment and approach for anticancer immunotherapy // *Immune Netw.* – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. e4.
2. Adeegbe D.O., Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 190.
3. Chatenoud L. Natural and Induced T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 677. – P. 3-13.
4. Wang Y., Li J., Nakahata S., Iha H. Complex Role of Regulatory T Cells (Tregs) in the Tumor Microenvironment: Their Molecular Mechanisms and Bidirectional Effects on Cancer Progression // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25, № 13. – P. 7346. <https://doi.org/10.3390/ijms25137346>
5. Facciabene A., Motz G.T., Coukos G. T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 9. – P. 2162-2171.
6. Guo Q., Zhou Y., Xie T., Yuan Y., Li H., Shi W., Zheng L., Li X., Zhang W. Tumor microenvironment of cancer stem cells: Perspectives on cancer stem cell targeting // *Genes Dis.* – 2024. – Vol. 11, № 3. – P. 101043. doi: 10.1016/j.gendis.2023.05.024
7. Diefenbach A., Raulet D.H. Strategies for target cell recognition by natural killer cells // *Immunol. Rev.* – 2001. – Vol. 181. – P. 170-184. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1810114.x
8. Lo Monaco E., Tremante E., Cerboni C., Melucci E., Sibilio L., Zingoni A., Nicotra M.R., Natali P.G., Giacomini P. Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells // *Neoplasia.* – 2011. – Vol. 13, № 9. – P. 822-830. doi: 10.1593/neo.101684
9. Sanchez-Correa B., Valhondo I., Hassouneh F., et al. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11, № 6. – P. 877. doi: 10.3390/cancers11060877
10. Hsu P., Santner-Nanan B., Hu M., Skarratt K., Lee C.H., Stormon M., Wong M., Fuller S.J., Nanan R. IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1 // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 195, № 8. – P. 3665-3674. doi: 10.4049/jimmunol.1402898
11. Togashi Y., Shitara K., Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 16, № 6. – P. 356-371.
12. Niedźwiecki M., Budziło O., Zieliński M., et al. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/-FoxP3⁺ Regulatory T Cell Subpopulations in the Bone Marrow and Peripheral Blood of Children with ALL: Brief Report // *J. Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 1292404. doi: 10.1155/2018/1292404
13. D'Arena G., Vitale C., Coscia M., et al. Regulatory T Cells and Their Prognostic Relevance in Hematologic Malignancies // *J. Immunol. Res.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 1832968. doi: 10.1155/2017/1832968
14. Kochan G., Escors D., Breckpot K., Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression // *Oncoimmunology.* – 2013. – Vol. 2, № 11. – P. e26491. doi: 10.4161/onci.26491
15. Kamiya T., Seow S.V., Wong D., et al. Blocking expression of the inhibitory receptor NKG2A overcomes tolerance of NK cells // *J. Clin. Invest.* – 2019. – Vol. 129, № 5. – P. 2094-2106. <https://doi.org/10.1172/JCI123955>
16. Fisher J.G., Doyle A.D.P., Graham L.V., et al. Disruption of the NKG2A:HLA-E immune checkpoint axis to enhance NK cell activation against cancer // *Vaccines (Basel).* – 2022. – Vol. 10, № 12. – P. 1993.

17. Matthew D.B., Salim I.K. Harnessing natural killer cell effector function against cancer // *Immunother. Adv.* – 2024. – Vol. 4, № 1. – P. Itad031. <https://doi.org/10.1093/immadv/ltad031>

18. Caocci G., Greco M., Fanni D., Senes G., Littera R., Lai S., et al. HLA-G expression and role in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma // *Eur. J. Histochem.* – 2016. – Vol. 60, № 2. – P. 2606. <https://www.ejh.it/ejh/article/view/2606>

19. Reimers M.S., Engels C.C., Putter H., et al. Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: a retrospective cohort study // *BMC Cancer.* – 2014. – Vol. 14. – P. 486. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-486>

20. Chen D., Gu X., Liu J., et al. Notch signaling in the tumor microenvironment: recent advances and targeted therapeutics // *Mol. Cancer.* – 2024. – Vol. 25. – P. 50. <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02555-9>

21. Arai J., Otoyama Y., Nozawa H., et al. The immunological role of ADAMs in the field of gastroenterological chronic inflammatory diseases and cancers: a review // *Oncogene.* – 2023. – Vol. 42, № 8. – P. 549-558.

REFERENCES

1. Kim J.H., Kim B.S., Lee S.K. Regulatory T cells in tumor microenvironment and approach for anticancer immunotherapy // *Immune Netw.* – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. e4.

2. Adeegbe D.O., Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 190.

3. Chatenoud L. Natural and Induced T CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 677. – P. 3-13.

4. Wang Y., Li J., Nakahata S., Iha H. Complex Role of Regulatory T Cells (Tregs) in the Tumor Microenvironment: Their Molecular Mechanisms and Bidirectional Effects on Cancer Progression // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25, № 13. – P. 7346. <https://doi.org/10.3390/ijms25137346>

5. Facciabene A., Motz G.T., Coukos G. T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 9. – P. 2162-2171.

6. Guo Q., Zhou Y., Xie T., Yuan Y., Li H., Shi W., Zheng L., Li X., Zhang W. Tumor microenvironment of cancer stem cells: Perspectives on cancer stem cell targeting // *Genes Dis.* – 2024. – Vol. 11, № 3. – P. 101043. doi: 10.1016/j.gendis.2023.05.024

7. Diefenbach A., Raulet D.H. Strategies for target cell recognition by natural killer cells // *Immunol. Rev.* – 2001. – Vol. 181. – P. 170-184. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1810114.x

8. Lo Monaco E., Tremante E., Cerboni C., Melucci E., Sibilio L., Zingoni A., Nicotra M.R., Natali P.G., Giacomini P. Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells // *Neoplasia.* – 2011. – Vol. 13, № 9. – P. 822-830. doi: 10.1593/neo.101684

9. Sanchez-Correa B., Valhondo I., Hassouneh F., et al. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11, № 6. – P. 877. doi: 10.3390/cancers11060877

10. Hsu P., Santner-Nanan B., Hu M., Skarratt K., Lee C.H., Stormon M., Wong M., Fuller S.J., Nanana R. IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1 // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 195, № 8. – P. 3665-3674. doi: 10.4049/jimmunol.1402898

11. Togashi Y., Shitara K., Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 16, № 6. – P. 356-371.

12. Niedźwiecki M., Budziło O., Zieliński M., et al. CD4+CD25highCD127low/-FoxP3+ Regulatory T Cell Subpopulations in the Bone Marrow and Peripheral Blood of Children with ALL: Brief Report // *J. Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 1292404. doi: 10.1155/2018/1292404

13. D'Arena G., Vitale C., Coscia M., et al. Regulatory T Cells and Their Prognostic Relevance in Hematologic Malignancies // *J. Immunol. Res.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 1832968. doi: 10.1155/2017/1832968

14. Kochan G., Escors D., Breckpot K., Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression // *Oncoimmunology.* – 2013. – Vol. 2, № 11. – P. e26491. doi: 10.4161/onci.26491

15. Kamiya T., Seow S.V., Wong D., et al. Blocking expression of the inhibitory receptor NKG2A overcomes tolerance of NK cells // *J. Clin. Invest.* – 2019. – Vol. 129, № 5. – P. 2094-2106. <https://doi.org/10.1172/JCI123955>

16. Fisher J.G., Doyle A.D.P., Graham L.V., et al. Disruption of the NKG2A:HLA-E immune checkpoint axis to enhance NK cell activation against cancer // *Vaccines (Basel).* – 2022. – Vol. 10, № 12. – P. 1993.

17. Matthew D.B., Salim I.K. Harnessing natural killer cell effector function against cancer // *Immunother. Adv.* – 2024. – Vol. 4, № 1. – P. Itad031. <https://doi.org/10.1093/immadv/ltad031>

18. Caocci G., Greco M., Fanni D., Senes G., Littera R., Lai S., et al. HLA-G expression and role in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma // *Eur. J. Histochem.* – 2016. – Vol. 60, № 2. – P. 2606. <https://www.ejh.it/ejh/article/view/2606>

19. Reimers M.S., Engels C.C., Putter H., et al. Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: a retrospective cohort study // *BMC Cancer.* – 2014. – Vol. 14. – P. 486. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-486>

20. Chen D., Gu X., Liu J., et al. Notch signaling in the tumor microenvironment: recent advances and targeted therapeutics // *Mol. Cancer.* – 2024. – Vol. 25. – P. 50. <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02555-9>

21. Arai J., Otoyama Y., Nozawa H., et al. The immunological role of ADAMs in the field of gastroenterological chronic inflammatory diseases and cancers: a review // *Oncogene.* – 2023. – Vol. 42, № 8. – P. 549-558.

INFLUENCE OF TREG-CELL SUBPOPULATIONS ON HLA-E EXPRESSION BY CHRONIC MYELOID LEUKEMIA AND BURKITT'S B-CELL LYMPHOMA CELLS

Kan S.A.^{*1,2,4} , Lushova A.V.^{1,2,4} , Tleulieva R.¹ , Abdolla N.^{1,2} , Tolendiyeva A.M.¹ , Perfil'yeva Yu.V.^{1,2} 
, Ostapchuk Ye.O.^{1,2,3} 

¹ M.A. Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Dosmukhamedov str. 86, 050012, tel. +7(727) 2937092, Almaty, Kazakhstan;

² Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, 14 Zhahanger St., Almaty, 050054, Kazakhstan

³ ECO-Consulting LLC, 143/93 Abay St., 4b Off., Almaty, 040907, Kazakhstan

⁴ Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, the Republic of Kazakhstan;

(E-mail: kan.soofiya@gmail.com, anzhelika.lushova@gmail.com, tleulieva@mail.ru, nurshat777@mail.ru, amina.tolendiyeva@mail.ru, ulya2005@mail.ru, katyostapchuk@gmail.com)

* Corresponding author: kan.soofiya@gmail.com

ABSTRACT

Modern research in the field of cancer immunology traditionally identifies T regulatory (Treg) cells as key suppressors of the antitumor immune response due to their direct inhibitory effects on effector populations, such as natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes. However, the direct influence of Treg cells on the biological and immunosuppressive properties of the tumor cells themselves remains insufficiently understood. Hematologic malignancies, including chronic myeloid leukemia and Burkitt's lymphoma, are hematopoietic neoplasms associated with a highly unfavorable prognosis during progression, largely driven by the tumor's ability to establish an immune-privileged microenvironment. In this study, we investigated the effect of natural (nTreg) and induced (iTreg) regulatory T cells on the expression of immunosuppressive molecules by chronic myeloid leukemia (K562) and Burkitt's B-cell lymphoma (Raji) cell lines in vitro. K562 and Raji cells were cultured either in direct contact with Treg cell subpopulations or in their culture supernatants, followed by flow cytometric analysis of immunosuppressive marker expression. We demonstrated that direct cell-to-cell contact with both nTreg and iTreg cells leads to a statistically significant upregulation of HLA-E expression on the surface of both investigated cell lines. These findings indicate that regulatory T cells are capable of modifying the tumor immunophenotype, thereby enhancing the capacity for immune evasion. Consequently, the results of this study expand current understanding of the role of Treg cells in the progression of hematologic malignancies and emphasize the necessity of considering their direct impact on tumor cells when developing novel immunotherapeutic strategies.

Keywords: T regulatory cells, markers of immunosuppression, chronic myeloid leukemia, Burkitt's B-cell lymphoma, HLA-E;

ТРЕГ-ЖАСУШАЛАРЫ СУБПОПУЛЯЦИЯЛАРЫНЫҢ СОЗЫЛМАЛЫ МИЕЛОЛЕЙКОЗ ЖӘНЕ БЕРКИТТ В-ЖАСУШАЛЫ ЛИМФОМАСЫНЫҢ ІСІК ЖАСУШАЛАРЫНДАҒЫ HLA-E ЭКСПРЕССИЯСЫНА ӘСЕРІ

Кан С.А.^{*1,2,4} , Лушова А.В.^{1,2,4} , Тлеулиева Р.Т.¹ , Абдолла Н.^{1,2} , Толендиева А.¹ , Перфильева Ю.В.^{1,2} 
Остапчук Е.О.^{1,2,3} 

¹ «М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты» ШЖҚ РМК, Досмухамедова даңғылы 86, 050012, Алматы, Қазақстан Республикасы;

² «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС Алматы қаласындағы филиалы, Алматы, Қазақстан Республикасы;

³ «ЭКО Консалтинг» ЖШС, ул. Абая даңғылы 143/93, Алматы, 040907, Қазақстан Республикасы;

⁴ «Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті» КЕАҚ, Алматы, Қазақстан Республикасы;

(E-mail: kan.soofiya@gmail.com, anzhelika.lushova@gmail.com, tleulieva@mail.ru, nurshat777@mail.ru, amina.tolendiyeva@mail.ru, ulya2005@mail.ru, katyostapchuk@gmail.com)

* Хат-хабар авторы: kan.soofiya@gmail.com

АНДАТПА

Онкоиммунология саласындағы заманауи зерттеулер реттегіш Т-жасушаларын (Treg) табиғи киллерлер мен цитотоксикалық Т-лимфоциттер секілді эффекторлы популяцияларға тікелей тежеуші әсер етуі арқылы ісікке қарсы иммундық жауаптың негізгі супрессорлары ретінде қарастырады. Дегенмен, Т-реттегіш жасушалардың ісік жасушаларының биологиялық және имуносупрессорлық қасиеттеріне тікелей әсері әлі де жеткіліксіз зерттелген. Гемобластоздар, соның ішінде созылмалы миелолейкоз бен Беркитт лимфомасы, ісіктің иммундық артықшылыққа ие микроортаны қалыптастыру қабілетіне байланысты, ауру үдеген кезде болжамы өте қолайсыз болып келетін қан түзу жүйесінің қатерлі ісіктеріне жатады. Бұл жұмыста табиғи (nTreg) және индукцияланған (iTreg) Т-реттегіш жасушалардың in vitro жағдайында K562 созылмалы миелолейкоз және Raji В-жасушалы Беркитт лимфомасы желілерінің имуносупрессорлық молекулаларды экспрессиялауына әсері зерттелді. K562 және Raji жасушалары Treg-жасушаларының субпо-

пуляцияларымен тікелей немесе олардың культуралдық супернатанттарында культивацияланды, содан кейін иммуносупрессорлық молекулалардың экспрессиясы ағымдық цитометрия әдісімен талданды. Ісік жасушаларының nTreg және iTreg жасушаларымен тікелей жанау арқылы өзара әрекеттесуі зерттелген екі желінің де беткейінде HLA-E молекуласы экспрессиясының статистикалық тұрғыдан сенімді жоғарылауына әкелетіні көрсетілді. Алынған мәліметтер реттегіш Т-жасушаларының ісік жасушаларының иммунофенотипін өзгертуге және олардың иммундық бақылаудан жалтару қабілетін күшейтуге қауқарлы екенін айғақтайды. Осылайша, жұмыс нәтижелері гемобластоздардың үдеуіндегі Т-реттегіш жасушалардың рөлі туралы қазіргі түсініктерді кеңейтеді және жаңа иммунотерапиялық тәсілдерді әзірлеу кезінде олардың ісік жасушаларына тікелей әсерін ескеру қажеттілігін негіздейді.

Түйін сөздер: реттегіш Т-жасушалары, иммуносупрессорлық маркерлер, созылмалы миелолейкоз, Беркитт В-жасушалы лимфомасы, HLA-E;