

На правах рукописи

Ломовская Яна Владимировна

**Резистентность клеток острого миелоидного лейкоза
к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке
в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения**

1.5.22. – Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Фадеев Роман Сергеевич

Официальные оппоненты: **Богуш Татьяна Анатольевна**, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, группа молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины, руководитель (г. Москва)

Яголович Анна Валерьевна, кандидат биологических наук, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория инженерии белка, научный сотрудник (г. Москва)

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (г. Москва)

Защита диссертации состоится «20» июня 2024 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета **24.1.232.01** на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”» по адресу: 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ФИЦ ПНЦ РАН по адресу: 142290 г. Пущино, ул. Институтская, д. 3 и на сайте <https://www.pbcras.ru>

Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, д.б.н.

Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является злокачественным новообразованием, характеризующимся крайне низкой излечиваемостью и выживаемостью, около 30 % пациентов с диагнозом ОМЛ достигают пятилетней выживаемости (Kantarjian et al., 2021; Short, Rytting, Cortes, 2018). Для ОМЛ характерна неконтролируемая экспансия и накопление (гиперклеточность) лейкозных бластов в костном мозге. Костный мозг при ОМЛ приобретает характеристики поврежденной ткани с признаками «стерильного» (безинфекционного) хронического воспаления (Cook, Luo, Rauh, 2020; Lasry et al., 2022). Воспалительный процесс в костном мозге способствует уклонению опухолевых клеток от гибели и является маркером плохого прогноза течения заболевания (Récher, 2021; Ellegast et al., 2022; Zhong et al., 2022). В свою очередь, хорошо известно, что активация провоспалительных сигнальных путей приводит к миелоидной дифференцировке нормальных «неопухолевых» моноцитов и гемопоэтических клеток-предшественников (Hernandez et al., 2020; Maltby et al., 2014; Mysore et al., 2022; Villar et al., 2023). В случае клеток ОМЛ провоспалительная активация с помощью бактериальных липополисахаридов (ЛПС) также способна индуцировать их дифференцировку в макрофагоподобном направлении (Kim, Hwang, Lee, 2022). В последнее время появляются данные о том, что дифференцированные, обладающие «зрелым» фенотипом клетки ОМЛ могут не только подавлять активность противоопухолевого иммунитета, но и являться более устойчивыми к действию широкого ряда противоопухолевых препаратов (Bottomly et al., 2022; Van Galen et al., 2019; Youen-Ermis et al., 2019). Таким образом, исследование возможности дифференцировки клеток ОМЛ в условиях «стерильного» воспалительного микроокружения представляет собой актуальную задачу прежде всего для идентификации новых механизмов развития как лекарственной устойчивости опухолевых клеток, так и устойчивости к компонентам противоопухолевого иммунитета.

Одним из ключевых молекулярных компонентов противоопухолевого иммунитета является родственный ФНО, индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL). Цитокин TRAIL связывается с четырьмя мембраносвязанными рецепторами: проапоптотическими DR4 и DR5, антиапоптотическими DcR1 и DcR2, а также с растворимым антиапоптотическим «рецептором» остеопротегерином (Montinaro, Walczak, 2023). Уникальность цитокина TRAIL заключается в селективной индукции гибели опухолевых клеток и в отсутствии

цитотоксического действия по отношению к здоровым клеткам организма (Gunalp et al., 2023; Liguori et al., 2016). Однако развитие у опухолевых клеток механизмов защиты от TRAIL-индуцированной гибели, и тем самым приобретение способности избегать действия противоопухолевого иммунного надзора, способствует возникновению и прогрессии ОМЛ, а также осложняет разработку таргетной терапии на основе TRAIL.

Ранее в рамках исследования роли микроокружения в лекарственной устойчивости клеток ОМЛ нами была представлена *in vitro* модель, имитирующая условия микроокружения лейкозных клеток при «стерильном» хроническом воспалении – долговременные трехмерные культуры клеток ОМЛ высокой плотности (гиперклеточности) (Kobyakova et al., 2022). В данной работе проведено изучение дифференцировки клеток ОМЛ в долговременной трехмерной культуре высокой плотности, с последующим исследованием их устойчивости к цитотоксическому действию ключевого молекулярного эффектора противоопухолевого иммунитета - цитокину TRAIL.

Целью является изучение устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели при дифференцировке в условиях гиперклеточного провоспалительного микроокружения *in vitro*.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценка возможности появления и характеристика дифференцированных TRAIL-резистентных клеток ОМЛ в условиях, имитирующих провоспалительное гиперклеточное микроокружение *in vitro*;
2. Изучение механизмов устойчивости дифференцированных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели;
3. Исследование возможности подавления устойчивости дифференцированных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели.

Новизна работы. В работе впервые показана возможность макрофагоподобной дифференцировки клеток ОМЛ в условиях, имитирующих клеточное микроокружение при «стерильном» хроническом воспалении - долговременной трехмерной гиперклеточной культуре. Дифференцированные макрофагоподобные клетки ОМЛ обладают устойчивостью к TRAIL-индуцированной гибели. Основными механизмами устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ к действию TRAIL являются потеря проапоптотических TRAIL-рецепторов и повышенная экспрессия ингибиторов апоптоза семейства IAP. Показана возможность подавления устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ

к TRAIL-индуцированной гибели с помощью индукторов поверхностной экспрессии TRAIL-рецепторов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показана принципиальная возможность подавления резистентности дифференцированных макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели при использовании таргетных соединений, таких как индукторы поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов. Это представляет интерес для разработки новых стратегий подавления первичной резистентности клеток ОМЛ при опухолевой гиперплазии костного мозга.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационного исследования является применение современных методик, комплексного анализа и системного подхода в изучении исследуемой темы. Работа выполнена на постоянных клеточных линиях острого миелоидного лейкоза человека и нативных макрофагах моноцитарного происхождения. Для достижения поставленной цели и решения конкретных задач в ходе работы были использованы современные методы клеточной биологии, биохимии, биофизики, молекулярной биологии и биоинформатики, такие как, проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, спектрофотометрия и флуориметрия, иммунофлуоресцентный анализ, количественная ПЦР, секвенирование РНК и анализ дифференциальной экспрессии генов с использованием пакета актуальных программ. Обработку данных проводили с помощью специализированного программного обеспечения, для статистического анализа результатов использовали односторонний ANOVA с поправкой на множественное тестирование Холма-Сидака и тест Вальда с поправкой на множественное тестирование Беньямини-Хохберга.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В *in vitro* модели, имитирующей условия провоспалительного микроокружения, долговременной трехмерной культуре клеток ОМЛ высокой плотности, образуются TRAIL-резистентные клетки с макрофагоподобным фенотипом.

2. Ингибирование экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4 и DR5, наряду с повышением экспрессии антиапоптотического представителя семейства IAP - cIAP2, приводит к резистентности макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели.

3. ИЛ-1 β -опосредованная активация провоспалительных сигнальных путей может регулировать формирование TRAIL-резистентности у макрофагоподобных клеток ОМЛ.

4. Применение низкомолекулярных индукторов экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов подавляет резистентность макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели.

Достоверность полученных результатов диссертации подтверждается достаточным количеством повторов проводимых экспериментов и применением сертифицированного научного оборудования, высококачественных расходных материалов и современных методик при проведении экспериментов. Анализ результатов выполнен с применением пакетов статистического анализа (MS Excel, SigmaPlot), а также языка программирования Python с использованием специализированных библиотек для работы с данными: numpy, pandas, scipy и scikit-learn. Результаты, полученные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Статистическую обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой на множественное тестирование Хомла-Сидака и теста Вальда с поправкой на множественное тестирование Беньямини-Хохберга.

Апробация. Основные результаты диссертационной работы были представлены на X Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-2017» (Казань, 2017), Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2017, 2019), Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2017, 2018, 2019), Международной научной конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии» (Алматы, 2019), XXVI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные Проблемы Биомедицины - 2020» (Санкт-Петербург, 2020), XI Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, 2020), III Объединённом научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021), IV Международной научной конференции «Наука Будущего – Наука Молодых» (Москва, 2021).

Личный вклад автора. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора и на данных, полученных при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию

результатов. Материалы, вошедшие в совместные публикации, обсуждались с соавторами и руководителем диссертационной работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 123 страницах, содержит 31 рисунок и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 322 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры и условия культивирования. Клетки ОМЛ человека THP-1 (TIB-202) были приобретены в Американской коллекции типовых клеточных культур (США). Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина сульфата. Для получения макрофагоподобного фенотипа клетки THP-1 инкубировали с 200 нМ форболового эфира (Sigma, США) в течение 96 ч. Нативные макрофаги получали из моноцитов периферической крови человека, выделенных с использованием набора MojoSort Human Pan Monocyte Isolation Kit (BioLegend, США). Для воспалительной активации клетки THP-1 культивировали в присутствии 10 мкг/мл ЛПС из *E. Coli* O111:B4 (Sigma, США) в течение 24 ч.

Протокол получения белка izTRAIL. Рекомбинантный человеческий белок TRAIL, содержащий последовательность изолейцинового zipper (izTRAIL), получен в соответствии с методикой (Fadeev et al., 2019) и предоставлен А.В. Чекановым.

Оценка пролиферации и жизнеспособности. Количество клеток в суспензии и их жизнеспособность определяли при окрашивании 200 нМ Calcein AM и 1 мкг/мл йодистого пропидия с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (BD Bioscience, США).

Анализ коротких tandemных повторов (STR). STR-типирование выполняли в ООО «ГОРДИЗ» (Россия).

Анализ фагоцитарной активности. Фагоцитарную активность клеток оценивали по внутриклеточному накоплению конъюгатов pHrodo Green *E. coli* (ThermoFisher Scientific, США) с помощью проточного цитометра BD Accuri C6.

Анализ окислительной активности, продукции NO и содержания лизосом. Внутриклеточную окислительную активность, продукцию NO и количество лизосом определяли при окрашивании DCFH-DA, DAF-FM DA и LysoTracker Green DND-26 (Thermo Fisher Scientific, Германия), соответственно, с помощью проточного цитометра BD Accuri C6.

Иммунофенотипирование и анализ экспрессии TRAIL-рецепторов. Поверхностную экспрессию маркеров CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD33, CD36, CD45, CD64, CD68, CD163, CD284, HLA-DR, DR4, DR5, DcR1 и DcR2 определяли при окрашивании соответствующими моноклональными антителами с помощью проточного цитометра BD Accuri C6.

Иммунофлуоресцентный анализ секреторных цитокинов. Секрецию цитокинов оценивали с помощью коммерческого набора Bio-Plex Pro Human Cytokine Grp I Panel 27-plex (Bio-Rad, США), используя Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad, США).

Секвенирование транскриптомов клеток. Секвенирование РНК для последующей оценки транскриптомов клеток проводили в ООО «Геноаналитика» (Москва, Россия) с использованием секвенатора HiSeq 1500 (Illumina, США).

Анализ дифференциальной экспрессии генов. Анализ дифференциальной экспрессии генов включал анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) по базе данных молекулярных сигнатур MSigDB (<https://www.gsea-msigdb.org/>), коллекций Hallmark и TFT с использованием программного пакета для языка программирования Python GSEApy. Анализ белок-белковых взаимодействий (ББВ) производился с использованием программного обеспечения Cytoscape (ver. 3.10.0) и подключаемого модуля CytoHubba.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Выделение тотальной РНК осуществляли с использованием набора innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Германия). Синтез и амплификацию кДНК проводили с использованием набора OneTube RT-PCR SYBR (Евроген, Россия) на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя.

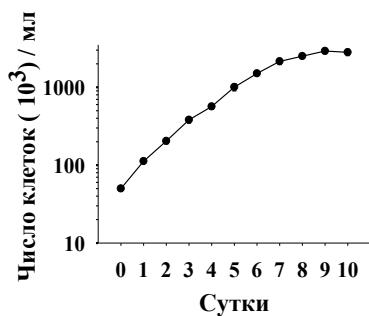
Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в пяти повторах ($n \geq 5$). Статистическую значимость отличия определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма-Сидака, $p < 0,05$. Для идентификации

достоверности изменения экспрессии генов применяли тест Вальда с поправкой на множественное сравнение Беньямини-Хохберга ($FDR \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение клеток ОМЛ, способных к адгезии и распластыванию на ВКМ, в условиях долговременной трехмерной суспензионной культуры высокой плотности

Для этого моноцитоподобные клетки ОМЛ ТНР-1 высевали в концентрации 5×10^4 кл/мл питательной среды в U-образные лунки 96-луночного планшета, покрытые фибронектином, и культивировали в течении 10 суток без смены питательной среды. Через 7 суток культивирования было обнаружено небольшое (менее 1%) количество клеток с гетерогенной морфологией, способных к прикреплению и распластыванию на твердом субстрате, покрытом фибронектином, что является критерием приобретения клетками более «зрелого» фенотипа (Brilha et al., 2017; Digiacomo et al., 2017; Sikkema et al., 2018). В этих условиях количество клеток в культуре составляло $2,2 \pm 0,2 \times 10^6$ кл/мл (Рис. 1а), количество погибших клеток не превышало $4,5 \pm 0,5\%$, количество лактата, глюкозы и рН составляло $5,5 \pm 0,4$ мМ, $7,4 \pm 0,8$ мМ и $7,1 \pm 0,3$, соответственно. Прикрепившиеся клоны изолировали путем удаления суспензии клеток, не способных к адгезии, и продолжали их культивирование в свежей питательной среде (Рис. 1б).



(а)

(б)

Рисунок 1. Кривая роста клеток ТНР-1 (а). Данные приведены в виде среднего значения \pm SD, ($n \geq 5$). Микрофотография клонов ТНР-1ад, способных к прикреплению и распластыванию на ВКМ, через 7 суток культивирования (б).

Процедуру получения клонов клеток ТНР-1, способных к прикреплению и распластыванию на твердом субстрате, проводили не

менее чем в 10 независимых повторах ($n \geq 10$). В результате были получены клоны ТНР-1ad (адгезионные), способные к прикреплению и распластыванию не только на покрытом фибронектином твердом субстрате, но и обладающие адгезией и распластыванием на поверхности культурального пластика без дополнительного покрытия компонентами ВКМ.

Таким образом, в условиях долговременной трехмерной суспензионной культуры клеток ОМЛ ТНР-1 высокой плотности, имитирующей условия провоспалительного микроокружения, возможно появление новых клеточных клонов ТНР-1ad, способных к прикреплению и распластыванию на твердом субстрате.

2. Характеристика клеток ОМЛ, способных к адгезии и распластыванию на ВКМ, полученных в условиях долговременной трехмерной суспензионной культуры высокой плотности

Анализ STR-локусов хромосомной ДНК установил, что генетический профиль клонов ТНР-1ad на 93% совпадает с профилем родительских клеток ОМЛ ТНР-1 (ТГВ-202, АТСС) и по общепринятым критериям является родственным по отношению к ним (Capes-Davis et al., 2013).

Дальнейшую характеристику клеток ТНР-1ad проводили в сравнении с родительскими недифференцированными клетками ТНР-1, с клетками ТНР-1РМА, обработанными РМА, известным индуктором макрофагоподобной дифференцировки, и с нативными макрофагами (Liu et al., 2023). Клетки ТНР-1ad обладали гетерогенной морфологией, включали сферическую и веретенообразную формы с выраженными псевдоподиями, в отличие от родительских ТНР-1 с исключительно сферической формой, и от клеток ТНР-1РМА и макрофагов, имеющих более выраженные веретенообразную или сферическую формы (Рис. 2).

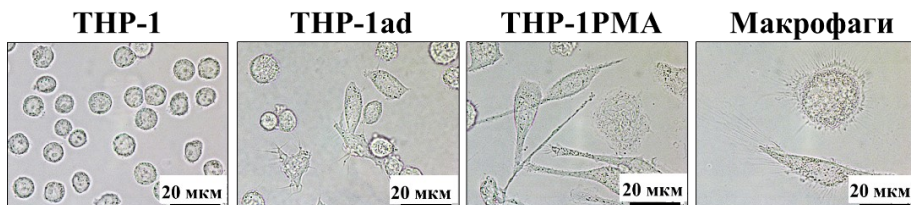
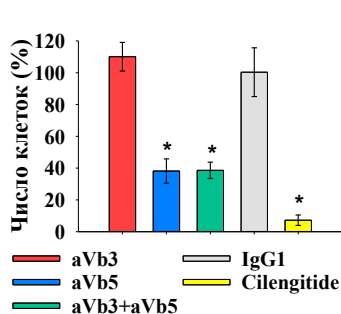


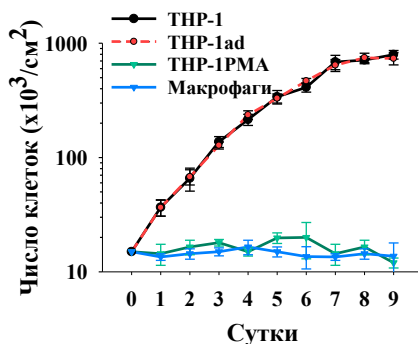
Рисунок 2. Морфология клеток ТНР-1, ТНР-1ad, ТНР-1РМА и нативных макрофагов. Микроскопия в проходящем свете. Объектив х63.

При исследовании интегрин-зависимой адгезии клеток ТНР-1ad применение RGD-пептида Cilengitide, антагониста интегринов αV , снижало количество прикрепленных клеток до 7 ± 5 %, а применение моноклональных антител против интегрин $\alpha V\beta 5$, но не интегрин $\alpha V\beta 3$ приводило к снижению количества прикрепленных клеток до 37 ± 11 %, относительно необработанных клеток (Рис. 3а).

Далее, было показано, что клетки ТНР-1ad сохраняют пролиферативную активность на уровне родительских недифференцированных клеток ТНР-1 (Рис. 3б).



(а)



(б)

Рисунок 3. Количество прикрепленных к твердому субстрату клеток ТНР-1ad при инкубации с антителами против $\alpha V\beta 3$ и $\alpha V\beta 5$, с контролем изотипа антител IgG1 и синтетическим RGD-пептидом Cilengitide (а). Кривая роста исследуемых клеток (б). Данные приведены в виде среднего значения \pm SD, ($n \geq 5$). * - $p < 0,05$ в сравнении контролем.

Следующим шагом было проведено иммунофенотипирование клеток ТНР-ad по основным маркерам макрофагальной дифференцировки (Frafjord et al., 2020; Liu et al., 2023; Unuvar Purcu et al., 2022). Клетки ТНР-1ad являлись положительными по маркерам CD11b, CD11c, CD14, CD284, которые отсутствовали у родительских клеток ТНР-1. Также у клеток ТНР-1ad, по сравнению с родительскими клетками ТНР-1, увеличивалась HLA-DR-положительная популяция с 21 ± 1 % до 60 ± 2 %.

Фагоцитарная активность является одной из ключевых характеристик макрофагальных клеток, с которой связано увеличение содержания лизосом, а также повышение продукции активных форм кислорода (АФК) и оксида азота (NO) (Canton et al., 2021; Fu, Harrison,

2021; García-Nicolás et al., 2023). При оценке фагоцитарной активности было обнаружено, что $90 \pm 6\%$ клеток THP-1ad фагоцитируют флуоресцентные частицы рHrodo Green *E. Coli*, что, в свою очередь, не отличается от показателя нативных макрофагов, где $78 \pm 7\%$ клеток фагоцитируют данные частицы, и выше показателя родительских клеток THP-1 (Рис. 4а). Относительное фагоцитарное число для клеток THP-1ad, определяемое по количеству фагоцитированных частиц (по интенсивности флуоресценции) также было выше, чем у родительских клеток THP-1 (Рис. 4б). В то же время было выявлено, что клетки THP-1ad содержали большее количество лизосом, чем родительские клетки THP-1 (Рис. 4в).

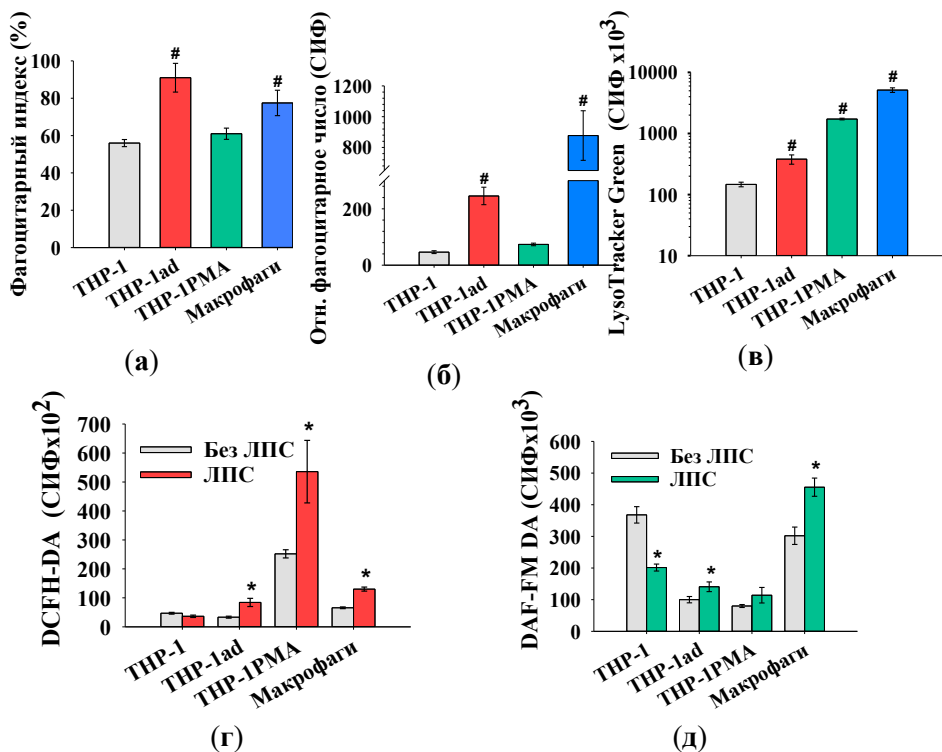


Рисунок 4. Фагоцитарный индекс (% фагоцитирующих клеток) (а); относительное фагоцитарное число (количество фагоцитированных частиц на клетку) (б); оценка содержания лизосом (в), конститутивной (без ЛПС) и ЛПС-индуцированной (ЛПС) продукции АФК (г) и оксида азота (д) у исследуемых клеток. СИФ - средняя интенсивность флуоресценции в пр. ед. # - $p < 0,05$ в ср. с THP-1. * - $p < 0,05$ в ср. с конститутивной продукцией. Среднее значение \pm SD, ($n \geq 5$).

В свою очередь, для клеток ТНР-1ad было показано ЛПС-зависимое повышение внутриклеточного содержания АФК, так же, как и в случае макрофагоподобных клеток ТНР-1PMA и нативных макрофагов (Рис. 4г). При исследовании продукции NO было показано, что у клеток ТНР-1ad, также, как и у нативных макрофагов происходило ЛПС-индуцированное повышение содержания внутриклеточного NO (Рис. 4д).

В заключение был исследован профиль секреции цитокинов и хемокинов у клеток ТНР-1ad, который является одной из ключевых макрофагальных характеристик (Murray, Stow, 2014; Niles et al., 2021). Для клеток ТНР-1ad была показана *de novo* продукция ИЛ-4, ФРФ, Г-КСФ, ГМ-КСФ, IP-10 и MIP-1 α , а также достоверно ($p < 0,05$) повышенная по сравнению с недифференцированными родительскими клетками ТНР-1, продукция ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-17а, MCP-1, MIP-1 β , ФНО- α и VEGF, что, в свою очередь, характерно для зрелых макрофагов.

Таким образом, способность клеток ТНР-1ad к интегрин-зависимой адгезии и распластыванию на ВКМ, наличие макрофаг-специфичного иммунофенотипа, выраженной фагоцитарной активности, увеличенного содержания лизосом, особенностей ЛПС-индуцированной продукции АФК и оксида азота, а также продукции специфических макрофагальных цитокинов и хемокинов указывает на приобретение ими более дифференцированного макрофагоподобного фенотипа. В то же время отличительной чертой данных клеток является сохранение основного свойства недифференцированных клеток ОМЛ – высокой пролиферативной активности.

3. Исследование устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ ТНР-1ad к TRAIL-индуцированной гибели

Известно, что направленная дифференцировка как здоровых гемопоэтических клеток, так и клеток ОМЛ может инициировать их устойчивость к цитотоксическому действию основного молекулярного эффектора противоопухолевого иммунитета - цитокину TRAIL (Mirandola et al., 2006; Secchiero et al., 2002; Shiiki et al., 2000). Поэтому далее, было проведено исследование чувствительности пролиферирующих макрофагоподобных клеток ТНР-1ad к TRAIL-индуцированной гибели. Цитотоксическое действие TRAIL на клетки ТНР-1ad анализировали в сравнении с родительскими недифференцированными клетками ТНР-1, с непролиферирующими макрофагоподобными клетками ТНР-1PMA, а также с нативными макрофагами (Рис. 5).

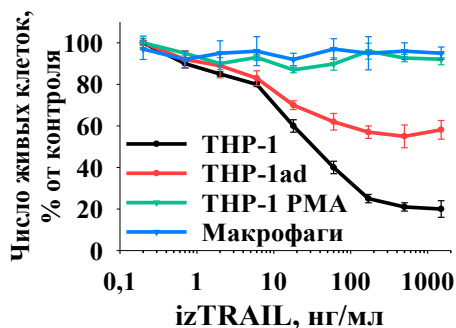


Рисунок 5. Цитотоксическое действие izTRAIL на клетки THP-1ad, THP-1, THP-1PMA и макрофаги. По оси ординат – число живых клеток в процентах, относительно контроля (необработанных клеток) через 24 часа после добавления izTRAIL. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD, ($n \geq 5$).

Было установлено, что izTRAIL даже при высоких концентрациях (до 1,5 мкг/мл) не вызывал токсического эффекта на макрофагоподобные клетки THP-1PMA и макрофаги, что указывает на их TRAIL-резистентность. Обнаружено, что количество TRAIL-нечувствительных THP-1ad клеток составляло $60 \pm 5\%$. Это указывает на повышение TRAIL-резистентности популяции клеток THP-1ad в сравнении с THP-1 (Рис. 5).

Таким образом, макрофагоподобные клетки ОМЛ THP-1ad, образовавшиеся в условиях воспалительного микроокружения, являются более устойчивыми к TRAIL-индуцированной гибели, чем недифференцированные родительские клетки ОМЛ THP-1, что, в свою очередь, выражается в существенном увеличении количества абсолютно резистентных к действию цитокина TRAIL клеток, и характерно для дифференцированных макрофагальных клеток.

4. Изучение механизмов устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели

Для определения основных сигнальных путей и потенциальных механизмов TRAIL резистентности у макрофагоподобных клеток THP-1ad было проведено полногеномное секвенирование РНК с последующим анализом дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) в сравнении с родительскими клетками THP-1.

Для идентификации активности внутриклеточных сигнальных путей был проведен анализ GSEA с использованием коллекции Hallmark базы данных MSigDB (Liberzon et al., 2011). В клетках THP-1ad наибольший положительный нормализованный показатель обогащения (НПО) был выявлен для наборов генов INTERFERON ALFA RESPONSE,

IL6 JAK STAT3 SIGNALING, INFLAMMATORY RESPONSE, INTERFERON GAMMA RESPONSE и TNFA SIGNALING VIA NF-KB, что указывает на активацию данных сигнальных путей. Также для клеток THP-1ad показано подавление активности путей MYC TARGETS V1, MYC TARGETS V2 и OXIDATIVE PHOSPHORYLATION, о чем свидетельствует наибольшее отрицательное значение НПО (Рис. 6а). Известно, что изменение активности идентифицированных процессов характерно для провоспалительной активации клеток и повышения устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели (Kopitar-Jerala, 2017; Bae et al., 2021; Hirano, 2021; Lee et al., 2019; Liu et al., 2016; Zelová, Hošek, 2013).

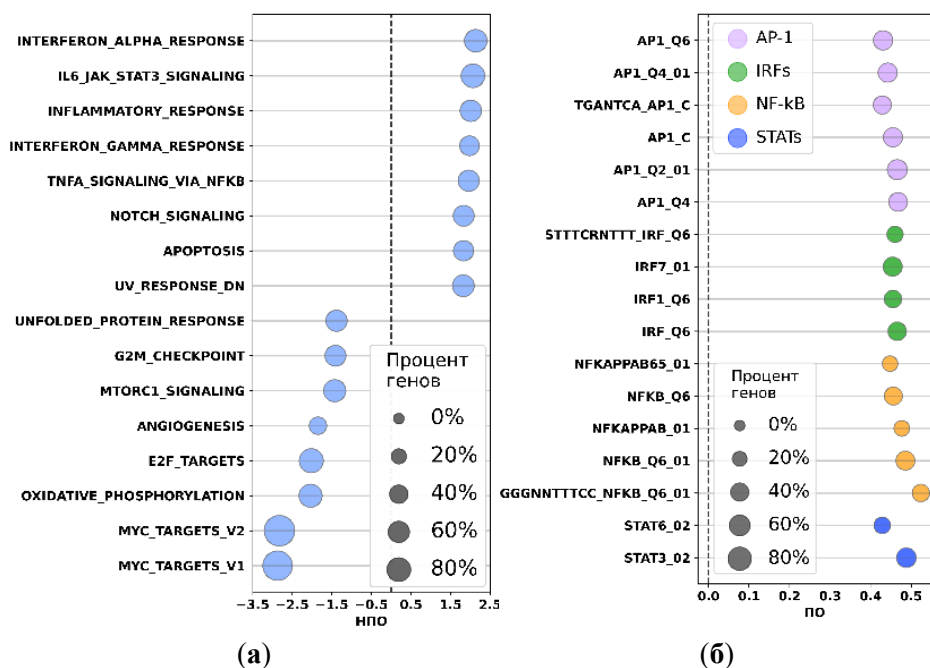


Рисунок 6. GSEA анализ наборов генов из коллекции Hallmark (а) и из коллекции C3 (субколлекция TFT:TFT LEGACY) для ТФ семейств AP-1, IRFs, NF-κB и STATs (б) у макрофагоподобных клеток THP-1ad, относительно недифференцированных родительских клеток THP-1. НПО – нормализованный показатель обогащения; ПО – показатель обогащения. FDR ≤ 0,05.

Далее, для идентификации наиболее вероятных транскрипционных факторов (ТФ), принимающих участие в активации выше представленных

сигнальных путей, у клеток ТНР-1а был проведен GSEA с использованием коллекции С3 (субколлекции TFT:TFT LEGACY). Было выявлено достоверное положительное обогащение ($FDR \leq 0.05$) наборов генов, содержащих промотерные последовательности для ТФ IRF1, IRF7, STAT3, STAT6, NF- κ B и AP-1, известных модуляторов воспаления в опухолевом микроокружении и устойчивости лейкозных клеток, что указывает на их выраженную транскрипционную активность (Huang, Lang, Li, 2022; Qing, Liu, 2023; Holicek et al., 2023; Karpathiou et al., 2021; Zhang et al., 2021) (Рис. 6б).

Затем, из всех достоверно транскрибируемых генов были отобраны ДЭГ с кратностью изменения (КИ): $-2 \geq \text{Log}_2(\text{КИ}) \geq 2$. Заданным параметрам соответствовали 355 ДЭГ, из которых 286 гена обладали повышенной экспрессией и 69 генов пониженной экспрессией. С помощью базы данных STRINGdb (<https://string-db.org/>) были построены сети взаимодействий для ДЭГ с повышенной и пониженной экспрессией. Было показано, что из 286 ДЭГ с повышенной экспрессией образуют взаимосвязанную сеть 167 генов, а из 69 ДЭГ с пониженной экспрессией взаимосвязанную сеть образуют только 8 генов.

Для идентификации наиболее вероятных генов-регуляторов сигнальных путей, активированных в макрофагоподобных клетках ТНР-1ад, среди взаимосвязанных генов с повышенной экспрессией была произведена кластеризация с использованием подключаемого к ПО Cytoscape модуля cytoHubba (Chin et al., 2014). В кластерах были выбраны 5 наиболее повторяющихся генов с наибольшим значением ранга («степени значимости»), таких как: *CSF1* - макрофагальный колониестимулирующий фактор, *PDGFRB* - рецептор для тромбоцитарного фактора роста, *MMP2* - матриксная металлопротеиназа 2, *SRC* - нерцепторная тирозинкиназа SRC и *IL1B* - интерлейкин 1 β (ИЛ-1 β). Известно, что продукты идентифицируемых генов-концентраторов контролируют ключевые процессы при миелоидном созревании, провоспалительной активации и прогрессии ОМЛ. (Mon, Senga, Ito, 2017; Sletta, Castells, Gjertsen, 2021; Pandey et al., 2023; Voisset et al., 2020).

Хорошо известно, что основными внутриклеточными позитивными регуляторами устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу являются представители семейств BCL-2 и IAP, блокирующие апоптоз как на уровне митохондрий, так и эффекторных каспаз (Garciaz et al., 2023; Hao et al., 2003; Saraei et al., 2018).

Было обнаружено, что среди идентифицированных генов-концентраторов с представителями семейства IAP показано

взаимодействие только для *MMP2* (партнеры *BIRC5* и *XIAP*), *IL1B* (партнеры *BIRC2*, *BIRC3*, *NAIP* и *XIAP*) и *SRC* (партнеры *BIRC2* и *XIAP*), а с представителями семейства BCL-2 взаимодействуют все идентифицированные гены-концентраторы, что указывает на потенциальную возможность их участия в устойчивости макрофагоподобных клеток THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели (Рис. 7а, б).

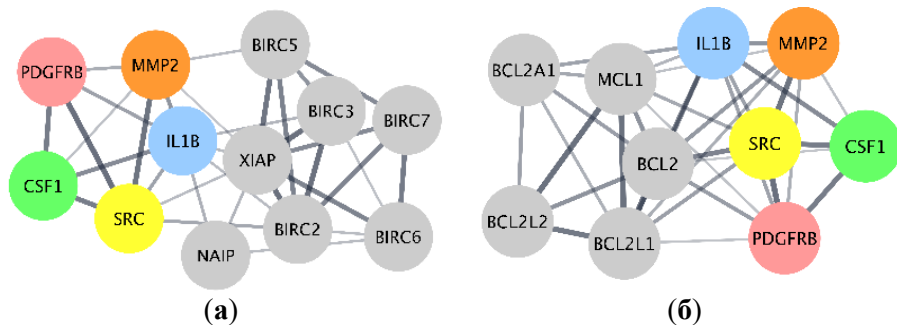


Рисунок 7. Сети взаимодействий продуктов идентифицированных генов-концентраторов *IL1B*, *SRC*, *PDGFRB*, *MMP2* и *CSF1* с антиапоптотическими представителями семейств IAP (а) и BCL-2 (б).

Далее, методом количественной ОТ-ПЦР была оценена экспрессия всех антиапоптотических членов семейства IAP и BCL-2 у макрофагоподобных клеток THP-1ad по отношению к родительским клеткам THP-1. А также у клеток THP-1PMA и THP-1ЛПС, обработанных известными индукторами макрофагальной дифференцировки и провоспалительной активации, соответственно (Chanput, Mes, Wichers, 2014; Page, Kell, Pretorius, 2022). Было показано, что у макрофагоподобных клеток THP-1ad увеличена экспрессия в 63 ± 7 раза гена *BIRC3*, кодирующего cIAP2 - ингибитор каспаз 3, 7, 8 и 10 (Mohamed et al., 2017). Схожие результаты были получены для клеток THP-1ЛПС, где также происходило увеличение в 42 ± 3 раза экспрессии гена *BIRC3* (Рис. 8а). Увеличение экспрессии представителей семейства BCL-2 было показано исключительно для *MCL-1* (в 48 ± 6 раза), известного ингибитора проапоптотических белков Вах и Бак, и только в случае клеток THP-1PMA (Sancho et al., 2022) (Рис. 8б).

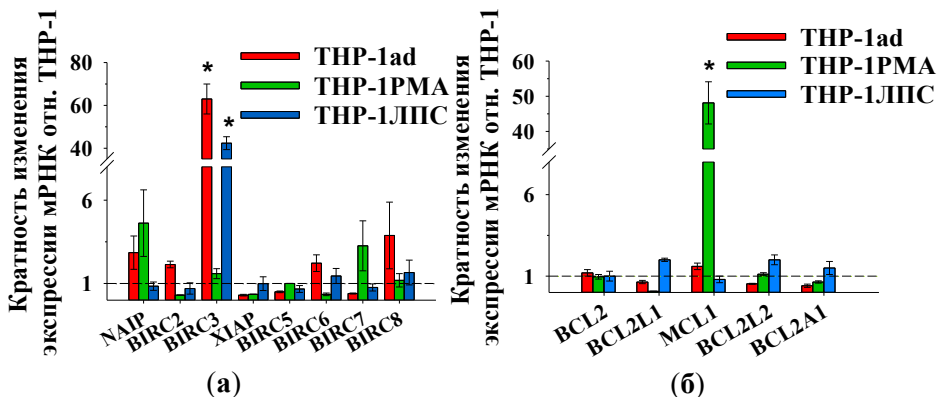


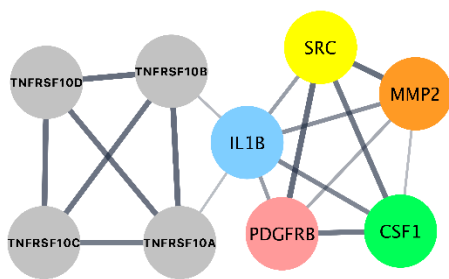
Рисунок 8. Оценка дифференциальной экспрессии генов семейств IAP (а) и BCL-2 (б) у клеток THP-1ad, THP-1PMA и THP-1ЛПС, относительно клеток THP-1. Данные приведены в виде среднего значения \pm SD ($n \geq 5$). * - $p < 0,05$ в сравнении с родительскими недифференцированными клетками THP-1.

В свою очередь, хорошо известно, что снижение поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4 и DR5 связано как с миелоидной дифференцировкой, так и с повышением устойчивости клеток к TRAIL-индуцированной гибели (Twomey et al., 2015; Miranda et al., 2006; Falschlehner et al., 2007).

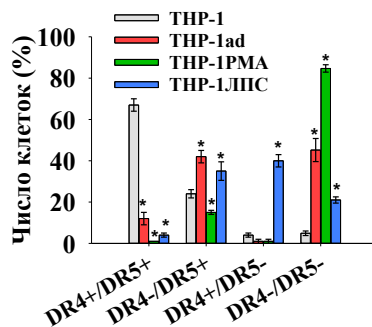
Было показано, что среди идентифицированных генов-концентраторов с мембраносвязанными проапоптотическими представителями семейства TRAIL-рецепторов взаимодействует только *IL1B* (партнеры *TNFRS10A* (DR4) и *TNFRS10B* (DR5)) (Рис. 9а).

Далее, методом проточной цитометрии было изучено распределение макрофагоподобных клеток THP-1ad, родительских клеток THP-1, клеток THP-1PMA и THP-1ЛПС по поверхностной ко-экспрессии рецепторов DR4 и DR5.

Было выявлено, что среди клеток THP-1ad, достоверно ($p < 0,05$), меньше DR4+/DR5+ ($12 \pm 3\%$) клеток и больше DR4-/DR5+ ($42 \pm 3\%$) клеток, относительно родительских клеток THP-1, $67 \pm 3\%$ и $24 \pm 2\%$, соответственно. Кроме того, среди клеток THP-1ad $45 \pm 5\%$ являются DR4-/DR5-, в отличие от родительских клеток THP-1, среди которых только $5 \pm 1\%$ DR4-/DR5- клеток. В свою очередь, среди клеток THP-1PMA и THP-1ЛПС популяция DR4-/DR5- клеток составляла $86 \pm 1\%$ и $21 \pm 2\%$, соответственно (Рис. 9б).



(а)



(б)

Рисунок 9. Сеть взаимодействий продуктов идентифицированных генов-концентраторов *IL1B*, *SRC*, *PDGFRB*, *MMP2* и *CSF1* с продуктами генов TRAIL-рецепторов (а) и оценка DR-положительных и DR-негативных популяций среди родительских клеток THP-1, макрофагоподобных клеток THP-1ad, клеток THP-1PMA и THP-1ЛПС (б). Данные приведены в виде среднего значения \pm SD, ($n \geq 5$). * - $p < 0,05$, относительно родительских клеток THP-1.

Таким образом, для макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad показано увеличение экспрессии гена *BIRC3*, кодирующего антиапоптотический белок cIAP-2, что также характерно для клеток ОМЛ при провоспалительной активации. Также для макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad показано выраженное увеличение DR4/DR5-негативной популяции клеток, что, в свою очередь, характерно для клеток ОМЛ, дифференцированных в макрофагальном направлении. Кроме того, ген *BIRC3* и гены TRAIL-рецепторов DR4 и DR5 являются партнёрами идентифицированного гена-концентратора *IL1B*, что указывает на участие $IL1\beta$ -опосредованной провоспалительной активации в формировании резистентности макрофагоподобных клеток THP-1ad к цитотоксическому действию TRAIL.

5. Оценка возможности подавления устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели

Было проведено изучение возможности подавления устойчивости макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели с помощью антагониста αV интегринов Cilengitide, химиотерапевтических препаратов доксорубина и цитарабина, низкомолекулярных ингибиторов тирозин-специфичных протеинкиназ

сорафениба, бозутиниба и квизартиниба, противовоспалительных соединений NF-kB Activation Inhibitor IV, преднизолона и диклофенака, а также индукторов поверхностной экспрессии TRAIL-рецепторов ONC201, туникамицина и субериоланилида гидроксамовой кислоты (SAHA) (Guo et al., 2017; Martin-Perez, Niwa, Lopez-Rivas, 2012). Для этого клетки THP-1ad предварительно инкубировали в течение 24 часов с максимально нетоксичными концентрациями данных соединений, после чего инкубировали с белком izTRAIL еще 24 часа.

Было показано, что применение антагониста α V-интегринов Cilengitide, ингибиторов тирозин-специфичных протеинкиназ, химиотерапевтических и противовоспалительных препаратов не снижало устойчивость макрофагоподобных клеток THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели (данные не представлены в автореферате).

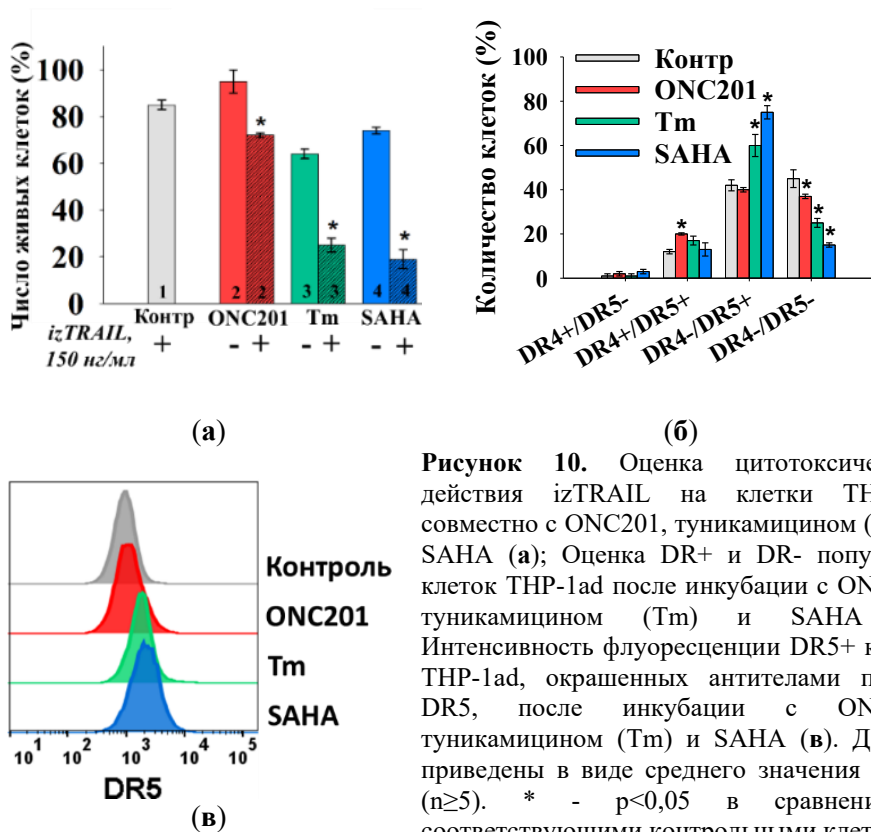


Рисунок 10. Оценка цитотоксического действия izTRAIL на клетки THP-1ad совместно с ONC201, туникамицином (Tm) и SAHA (а); Оценка DR⁺ и DR⁻ популяций клеток THP-1ad после инкубации с ONC201, туникамицином (Tm) и SAHA (б). Интенсивность флуоресценции DR5⁺ клеток THP-1ad, окрашенных антителами против DR5, после инкубации с ONC201, туникамицином (Tm) и SAHA (в). Данные приведены в виде среднего значения \pm SD, ($n \geq 5$). * - $p < 0,05$ в сравнении с соответствующими контрольными клетками.

В свою очередь, предварительная инкубация с туникамицином, SAHA и ONC201 снижала количество TRAIL-резистентных клеток до $25\pm 3\%$, $19\pm 4\%$ и $71\pm 2\%$, соответственно (Рис. 10а).

Также было показано, что инкубация клеток THP-1ad с туникамицином и SAHA приводила к увеличению числа DR4-/DR5+ клеток до $60\pm 5\%$ и $75\pm 3\%$, а также снижению количества DR4-/DR5- клеток, до $25\pm 2\%$ и $15\pm 1\%$, соответственно. При применении препарата ONC201, было показано достоверное ($p < 0,05$), но незначительное, снижение количества только DR4-/DR5- клеток до $37\pm 1\%$ (Рис. 10б). Дополнительно, инкубация клеток с туникамицином и SAHA, но не с препаратом ONC201, приводила к увеличению поверхностной экспрессии проапоптотического TRAIL-рецептора DR5 (Рис. 10в)

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что применение в нетоксических концентрациях препаратов, увеличивающих поверхностную экспрессию TRAIL-рецептора DR5, таких как туникамицин и SAHA, подавляет устойчивость макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз — это гетерогенная опухоль гемопоэтической системы, состоящая из миелоидных клеток разной степени зрелости (дифференцировки), от недифференцированных бластов до практически зрелых лейкоцитов с частично утраченными специфическими функциями, и выраженным воспалительным микроокружением. Характерной чертой нормальных зрелых миелоидных клеток, в отличие от незрелых клеток ОМЛ, является их устойчивость к индукции рецептор-опосредованного апоптоза посредством лигандов Fas и TRAIL, являющихся, прежде всего, ключевыми молекулярными эффекторами противоопухолевого иммунитета. Принято считать, что воспалительная активация нормальных миелоидных клеток запускает в них программу дальнейшего созревания и дифференцировки в уже специализированные клетки. В свою очередь, вопрос о возможности индукции дифференцировки, то есть фактически приобретения резистентности к молекулярным эффекторам противоопухолевого иммунитета, у клеток ОМЛ посредством воспалительного микроокружения, остается открытым.

Результаты работы показывают, что в *in vitro* модели, имитирующей условия микроокружения лейкозных клеток при

«стерильном» хроническом воспалении – гиперклеточной долговременной трехмерной культуре клеток ОМЛ, может индуцироваться макрофагальная дифференцировка. Однако такие макрофагоподобные клетки ОМЛ, на примере полученных в работе клеток THP-1ad, в отличие от нативных макрофагов, сохраняют пролиферативную активность родительских недифференцированных бластных лейкозных клеток и, при этом, приобретают резистентность к основному молекулярному эффектору противоопухолевого иммунитета - цитокину TRAIL. Для таких макрофагоподобных клеток ОМЛ характерна конститутивная активация внутриклеточных провоспалительных сигнальных путей под контролем транскрипционных факторов семейств NF- κ B, AP-1, STAT и IRF.

На рисунке 11 представлен гипотетический механизм резистентности макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели. Резистентность к TRAIL-индуцированной гибели у макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad связана, как мы полагаем, с подавлением поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4 и DR5, а также с повышением экспрессии внутриклеточного ингибитора эффекторных каспаз cIAP2.

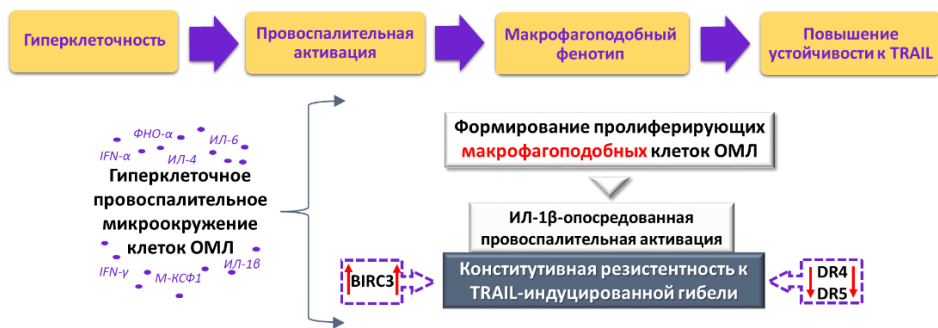


Рисунок 11. Гипотетический механизм резистентности макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad к TRAIL-индуцированной гибели.

Полученные результаты указывают на то, что в качестве потенциального регулятора устойчивости к TRAIL-индуцированной гибели у таких макрофагоподобных клеток ОМЛ может выступать интерлейкин 1 β , который является одним из основных интеграторов сигналов провоспалительной активации и NF- κ B-зависимого контроля поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4 и DR5.

В свою очередь, снижение TRAIL-резистентности макрофагоподобных клеток ОМЛ THP-1ad может быть достигнуто посредством стимуляции поверхностной экспрессии проапоптотического TRAIL-рецептора DR5 с помощью туникамицина и субероиланилида гидроксамовой кислоты.

Полученные данные интересны и важны для нормальной физиологии клеток, так как описывают биологическую основу клеточной дифференцировки, а для патологической физиологии - с точки зрения изучения влияния условий патологического микроокружения на функционирование клеток и, в перспективе, для практического применения, так как показывают принципиальную возможность коррекции изучаемых патологических процессов.

ВЫВОДЫ

1. В долговременной трехмерной культуре клеток ОМЛ высокой плотности, имитирующей условия провоспалительного микроокружения, происходит образование дифференцированных TRAIL-резистентных макрофагоподобных клеток.

2. Резистентность дифференцированных макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели опосредована подавлением экспрессии проапоптотических рецепторов DR4 и DR5 и повышением экспрессии ингибитора каспаз cIAP2.

3. Формирование TRAIL-резистентности дифференцированных макрофагоподобных клеток ОМЛ реализуется при участии ИЛ-1 β -опосредованной активации провоспалительных сигнальных путей.

4. Резистентность дифференцированных макрофагоподобных клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели может быть снижена с помощью низкомолекулярных индукторов экспрессии проапоптотических TRAIL рецепторов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ломовская Я.В.** Исследование активации сигнальных путей в TRAIL-резистентных макрофагоподобных клетках острого миелоидного лейкоза / Ломовская Я.В., Краснов К.С., Кобякова М.И., Колотова А.А., Ермаков А.М., Сенотов А.С., Фадеева И.С., Фетисова Е.И., Ломовский

А.И., Звягина А.И., Акатов В.С., Фадеев Р.С. // Acta Naturae – 2024 – Vol.60(1). P. 48-58.

2. Kobyakova M.I. Pro-Inflammatory Activation Suppresses TRAIL-induced Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells / Kobyakova M.I., Senotov A.S., Krasnov K.S., **Lomovskaya Y.V.**, Odinkova I.V., Kolotova A.A., Ermakov A.M., Zvyagina A I., Fadeeva I.S., Fetisova E.I., Akatov V.S., Fadeev R.S. // Biochemistry (Moscow) — 2024 — Vol. 89(3) P. 431-440.

3. **Lomovskaya Y.V.** Macrophage-like THP-1 Cells Derived from High-Density Cell Culture Are Resistant to TRAIL-Induced Cell Death via Down-Regulation of Death-Receptors DR4 and DR5 / Lomovskaya Y.V., Kobyakova M.I., Senotov A.S., Lomovsky A.I.; Minaychev V.V., Fadeeva I.S., Shtatnova D.Y., Krasnov K.S., Zvyagina A.I., Akatov, V.S., Fadeev R.S. // Biomolecules — 2022 — Vol. 12(2). P. 150.

4. **Lomovskaya Ya.V.** Myeloid differentiation increases resistance of leukemic cells to TRAIL-induced death by reducing the expression of DR4 and DR5 receptors / Lomovskaya Ya.V., Kobyakova M.I., Senotov A.S., Fadeeva I.S., Lomovsky A.I., Krasnov K.S., Shtatnova D.Yu., Akatov V.S., Fadeev R.S // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology — 2022 — Vol. 17. P. 43–57.

5. **Evstratova (Lomovskaya) Y.V.** Monocyte-Macrophage Differentiation Suppresses the Expression of Proapoptotic Receptors to Apo2L/TRAIL and Increases Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis / Evstratova Y.V., Kobyakova M.I., Novikova V.V., Senotov A.S., Akatov V.S., Fadeev R.S // Biophysics — 2019 — Vol. 64. P. 729–731.

По результатам работы опубликовано 14 тезисов в сборниках материалов конференций.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований №20-34-90061 (рег. № АААА-А20-120100890070-8) и постановления Правительства РФ от 09.04.10 №220 («Мегагранты», договор №14.Z50.31.0028), а также Совета по грантам Президента Российской Федерации в рамках Стипендии Президента РФ (СП-606.2019.4).