

УДК 57.085.23,616.155.392.8

ПОЯВЛЕНИЕ ПРИЗНАКОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА У КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА TNF-1 ПРИ ПОВЫШЕНИИ ИХ TRAIL-РЕЗИСТЕНТНОСТИ В АГРЕГАТАХ *IN VITRO*

© 2021 г. М. И. Кобякова^a, Я. В. Евстратова^a, А. С. Сенотов^a, А. И. Ломовский^a,
В. В. Минайчев^a, А. И. Звягина^a, М. Е. Соловьева^a,
И. С. Фадеева^a, В. С. Акатов^a, Р. С. Фадеев^a, *

^aИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, 142290 Россия

*e-mail: fadeevrs@gmail.com

Поступила в редакцию 03.08.2020 г.

После доработки 09.09.2020 г.

Принята к публикации 10.09.2020 г.

Ранее нами было обнаружено значительное повышение TRAIL (TNF α Related Apoptosis Inducing Ligand) резистентности клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) в многоклеточных агрегатах *in vitro*, моделирующих расположение лейкозных клеток в костном мозге. В представленной работе мы попытались оценить, может ли быть связано повышение резистентности клеток ОМЛ к цитотоксическому действию TRAIL в многоклеточных агрегатах *in vitro* с запуском механизмов, опосредованных дифференцировкой клеток или приобретением ими провоспалительного фенотипа. Было выполнено исследование фенотипа клеток TNF-1 в агрегированной и дезагрегированной культурах в сравнении с фенотипом дезагрегированной культуры клеток TNF-1, подвергнутой действию факторов, индуцирующих моноцитоподобную дифференцировку или провоспалительный фенотип. Установлено, что повышение TRAIL-резистентности клеток TNF-1 в агрегированной культуре сопровождается появлением у них признаков, характерных для моноцитоподобной дифференцировки и провоспалительного фенотипа. Результаты представляют интерес для разработки подходов подавления TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в костном мозге человека.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, TRAIL-резистентность опухолевых клеток, многоклеточные агрегаты *in vitro*, дифференцировка, провоспалительный фенотип

DOI: 10.31857/S0233475521010059

ВВЕДЕНИЕ

Выяснение механизмов резистентности опухолевых клеток к противоопухолевой терапии и к иммунному надзору, в частности, к известному индуктору апоптотической рецептор-опосредованной гибели опухолевых клеток, цитокину TRAIL (TNF α Related Apoptosis Inducing Ligand), является одной из центральных задач онкологии. Ранее нами было обнаружено значительное повышение TRAIL-резистентности клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) *in vitro* в многоклеточных агрегатах, которые моделируют расположение лейкозных клеток в костном мозге [1, 2].

Список сокращений: TRAIL – TNF α Related Apoptosis Inducing Ligand; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; izTRAIL – рекомбинантная форма тримерного белка TRAIL, включающего внеклеточный домен белка TRAIL и изолейциновый zipper; LPS – липополисахарид бактериальный; ATRA – *транс*-ретиноевая кислота (All Trans Retinoic Acid).

Повышение TRAIL-резистентности было обнаружено также у клеток различных линий, полученных из солидных опухолей (сарком, карцином, глиом, нейробластом и т.д.), при формировании ими конфлюэнтного монослоя или клеточных сфероидов *in vitro* [3–7]. В связи с этим изучение механизмов повышения резистентности опухолевых клеток, в частности клеток ОМЛ, в многоклеточных агрегатах к цитотоксическому действию лиганда TRAIL представляет интерес для онкологии.

Известно, что в процессе дифференцировки клеток моноцитарного ряда наблюдается активация внутриклеточных сигнальных путей выживания [8]. Так, созревание в моноцитарном направлении у нормальных клеток может сопровождаться повышенной экспрессией антиапоптотических белков, таких как Bcl-XL, XIAP (через активацию транскрипционного фактора STAT3) [9] и/или

Bcl-2 (через активацию сигнального каскада Akt/P13K) [10]. Кроме того, в механизмах защиты моноцитов от индукции клеточной гибели могут участвовать белки теплового шока (Hsp), в частности Hsp27, Hsp70 и Hsp90 [10]. Также в наших публикациях было показано, что снижение экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов и, соответственно, повышение TRAIL-устойчивости происходит на фоне дифференцировки миелоидных клеток в моноцитарно-макрофагальном направлении как при направленной дифференцировке лейкозных бластов, так и при созревании нормальных моноцитов периферической крови в макрофаги [11]. В то же время известно, что активация клеток моноцитарного ряда липополисахаридом, цитокинами TNF α , IL-1 β , в ходе которой они приобретают провоспалительный фенотип, может также защищать их от гибели. Показано, что активация клеток моноцитарного ряда может сопровождаться активацией транскрипционного фактора NF- κ B и, как следствие, повышенной экспрессией антиапоптотических белков семейств Bcl-2 и IAP [12, 13], а также индукцией секреции провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-1 β , -6, -8, -10, -12, -15 [14], способной повысить выживаемость клеток [10]. В связи с этим возникает вопрос, может ли быть связано повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах *in vitro* с дифференцировкой клеток или с приобретением ими провоспалительного фенотипа. В представленной работе мы попытались ответить на этот вопрос.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В работе использовали клетки острого миелоидного лейкоза человека, линии ТНР-1, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), а также первичную культуру моноцитов периферической крови человека, полученную от здоровых доноров из ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Первичная культура моноцитов была получена из мононуклеарной фракции периферической крови с использованием набора MojoSort Human Pan Monocyte Isolation Kit (BioLegend, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Моноциты культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) 80 мкг/мл гентамицина, 24 мкг/мл флуконазола при 37°C и 5% CO₂ в газовой фазе в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч. Для прикрепления моноцитов от поверхности культуральной посуды использовали фермент Accutase (Sigma, США). Клетки ТНР-1 культивировали в среде RPMI 1640/F12 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 80 мкг/мл гентами-

цина, 24 мкг/мл флуконазола при 37°C и 5% CO₂ в газовой фазе в CO₂-инкубаторе. Клетки линии ТНР-1 спонтанно формировали агрегаты, состоящие из 10–50 клеток через 24 ч после посева 15×10^3 клеток/см².

Получение белка izTRAIL. Для получения тримерной формы белка izTRAIL синтезировали мотив изолейциновой застеежки и ген *izTRAIL*, которые в дальнейшем клонировали в плазмидном векторе pET101 (Novagen, США). Полученным геном трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3) и методом микробного синтеза с последующей очисткой металл-аффинной хроматографии получали тримерную форму izTRAIL с молекулярной массой 80 кДа [15, 16]. Показано, что полученный рекомбинантный белок TRAIL вызывает апоптотическую гибель опухолевых клеток в культуре [16].

Активация провоспалительного фенотипа и моноцитоподобной дифференцировки у клеток ТНР-1. Для активации провоспалительного фенотипа клетки ТНР-1 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии 10 мкг/мл липополисахарида (LPS) из *E. coli* O111:B4 (Sigma, США) в течение 24 ч. [17, 18]. Для получения моноцитоподобной дифференцировки клетки ТНР-1 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии 1 мкМ АТРА (Sigma, США) в течение 96 ч [19]. Затем клетки трижды отмывали средой DMEM/F12 и использовали для экспериментов.

Формирование многоклеточных агрегатов. Для формирования многоклеточных агрегатов клетки высевали по 5×10^3 клеток в лунку в 100 мкл ростовой среды в 96-луночные планшеты, покрытые 1.5% гелем агарозы толщиной 1 мм (Panreac, Испания) и культивировали в течение 5 дней (120 ч). Формированию агрегатов способствовала U-образная форма агарозного геля на дне лунки. Через 120 ч после посева в каждой лунке наблюдали крупные одиночные агрегаты клеток. Клетки в агрегатах были слабо связаны, и стандартное пипетирование культуры позволяет получить из агрегатов суспензию живых одиночных клеток.

Анализ цитотоксического действия белка izTRAIL. Для анализа цитотоксического действия белка izTRAIL клетки из растущих культур высевали в 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты по 5×10^3 клеток в 100 мкл ростовой среды в лунки, дно которых было покрыто слоем 1.5% агарозного геля (Panreac, Испания) толщиной 1 мм, способствующего формированию агрегатов, или без покрытия агарозным гелем. Цитотоксическое действие izTRAIL оценивали по отношению количества живых клеток в опытных и контрольных (без добавления izTRAIL) культурах через 24 ч после добавления izTRAIL. Белок

izTRAIL добавляли через 24 ч после посева клеток в лунки, не покрытые агарозным гелем, или через 120 ч после посева клеток в лунки, покрытые агарозным гелем. Количество живых клеток после инкубации с izTRAIL оценивали по интенсивности восстановления резазурина (Sigma, США). Для этого к клеткам добавляли резазурин в концентрации 30 мкг/мл. Далее клетки инкубировали с красителем в течение 4 ч при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 532 нм и длине волны испускания 590 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 (Tecan, Австрия) [20].

Анализ пролиферативной активности. Для определения пролиферативной активности оценивали распределение клеточной популяции по фазам клеточного цикла, митотическую активность клеток, экспрессию ядерного антигена Ki-67. Для изучения распределения по фазам клеточного цикла, клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере (300 g, 5 мин), фиксировали 70% этанолом (24 ч, -20°C), окрашивали йодидом пропидия. Для анализа экспрессии Ki-67 клетки окрашивали моноклональными антителами против Ki-67 человека, конъюгированными с PE (Biolegend, США). Для определения неспецифического связывания клетки окрашивали антителами контроля изотипа PE Mouse IgG1, k isotype Ctrl (Biolegend, США). Для анализа флуоресценции клеток и построения ДНК-цитогрaмм использовали проточный цитометр BD Accuri C6 (BD Bioscience, США). Полученные результаты обрабатывали с использованием программы ModFit LT 4.1. Митотический индекс и жизнеспособность оценивали, окрашивая суспензию клеток в культуральной среде флуоресцентными ядерными красителями Hoechst 33342 и йодидом пропидия в концентрации 1 мкг/мл и подсчитывая число живых, погибших, а также митотических клеток с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (Leica, Германия), используя камеры Горяева [16, 21].

Иммунофенотипирование клеток. Клетки для иммунофенотипирования отмывали в буферном растворе для окрашивания клеток (Biolegend, США) при 300 g в течение 5 мин, окрашивали их, используя панель конъюгированных с FITC человеческих моноклональных антител против CD11b (Biolegend США), CD11c, CD14 и CD45 (Sigma, США), CD163 и CD68 (BD Bioscience, США), а также конъюгированных с PE моноклональных человеческих антител CD284 и HLA-DR (Biolegend США). Для определения неспецифического связывания клетки окрашивали антителами-контролями изотипов: FITC Mouse IgG1, k isotype Ctrl, PE Mouse IgG1 k isotype и PE Mouse IgG2a k isotype (Biolegend, США). Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После окрашивания клетки фикси-

ровали 2% раствором параформальдегида (Panreac, Испания). Измерение флуоресценции выполняли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6.

Определение гранулярности цитоплазмы. Определение гранулярности цитоплазмы клеток проводили по боковому рассеянию света (SSC) на проточном цитометре Accuri C6.

Анализ фагоцитарной активности клеток. Фагоцитарную активность клеток оценивали после 2 ч инкубации их в CO₂-инкубаторе в ростовой среде с добавлением в нее 1 мг/мл pHrodo Green *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, Германия). Для контроля неспецифического окрашивания клетки инкубировали с 10 мкг/мл цитохалазина D (Sigma, США) в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе, затем добавляли 1 мг/мл pHrodo Green *E. coli* и далее инкубировали в течение 2 ч. Измерение флуоресценции осуществляли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6. Оценку фагоцитарной активности проводили с использованием показателей фагоцитарного числа и индекса. Фагоцитарный индекс отражает процент клеток в популяции, способных к поглощению бактерий (оценивали по числу флуоресцентных клеток в процентах относительно общего числа клеток). Фагоцитарное число – среднее число бактерий, поглощенное одним фагоцитом (оценивали по средней интенсивности флуоресценции клеток, способных к фагоцитозу) [22].

Оценка внутриклеточного содержания оксида азота (NO). Для оценки внутриклеточной продукции NO клетки инкубировали в ростовой среде в течение 40 мин после добавления в нее 5 мкМ флуоресцентного NO-зонда DAF-FM DA (Thermo Fisher Scientific, Германия). Далее клетки отмывали в ростовой среде (300 g, 5 мин) и инкубировали в ней в течение 30 мин. Все процедуры инкубации выполняли при 37°C и 5% CO₂. Интенсивность флуоресценции клеток измеряли, используя проточный цитофлуориметр BD Accuri C6 [22].

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма–Сидака, $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клетки ТНР-1 приобретают в агрегатах in vitro такую же TRAIL-резистентность, как после воздействия дифференцирующего фактора АТРА или провоспалительного стимула LPS

Мы сравнили TRAIL-резистентность клеток ОМЛ линии ТНР-1 в многоклеточных агрегатах (1), после индукции у этих клеток моноцитоподоб-

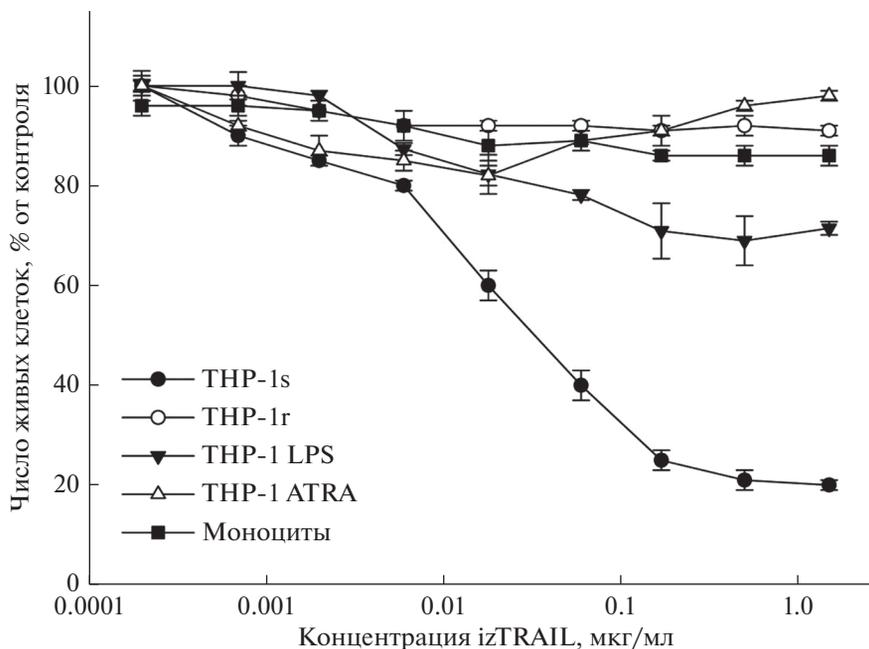


Рис. 1. Цитотоксическое действие рекомбинантного белка izTRAIL на клетки THP-1, культивируемые 24 ч в планшете (нет агрегата, THP-1s), либо 120 ч в агрегате на агарозном геле (THP-1r), либо предварительно обработанные ATRA (1 мкМ, 96 ч) и затем культивируемые 24 ч (нет агрегата) (THP-1 ATRA), либо предварительно обработанные LPS (10 мкг/мл, 24 ч) и затем культивируемые 24 ч (нет агрегата) (THP-1 LPS) и моноциты крови человека (нет агрегата).

ной дифференцировки трансретиновой кислотой ATRA (2), после активации в этих клетках провоспалительного фенотипа посредством LPS (3) и TRAIL-резистентность моноцитов периферической крови человека (4) (рис. 1).

Было установлено, что как после LPS-индуцированной активации провоспалительного фенотипа у клеток THP-1 (THP-1 LPS), так и после индукции в них моноцитоподобной дифференцировки транс-ретиновой кислотой (THP-1 ATRA) происходило формирование их TRAIL-резистентности. Эти клетки в основном (около 100% после ATRA и около 80% после LPS) были резистентными к цитотоксическому действию izTRAIL даже при его концентрации 1.5 мкг/мл, так же как клетки THP-1 в агрегатах (около 100 тысяч) на агарозном геле (далее THP-1r) и моноциты периферической крови человека. Однако эти же клетки THP-1 были высокочувствительными к действию izTRAIL через 24 ч после посева 5 тысяч клеток в лунку 96-луночного планшета, когда не было образования больших агрегатов (THP-1s). Величина IC₅₀ белка izTRAIL (концентрация агента, при количестве клеток в опыте в 2 раза меньше, чем в контроле) для клеток THP-1s равна 2.1 ± 0.5 нг/мл, а доля TRAIL-резистентной субпопуляции в этом случае составляла 20% (“полочка” при концентрациях izTRAIL около 1 мкг/мл, рис. 1).

Клетки THP-1r, как и клетки THP-1s, пролиферировали. Процент клеток THP-1r в сравнении

с THP-1s достоверно увеличивался в G₁/G₀-фазе ($p \leq 0.01$), уменьшался в S-фазе ($p \leq 0.02$) и не отличался достоверно в G₂/M- и M-фазах (рис. 2). Процент клеток THP-1s в M-фазе составлял $2.0 \pm 0.3\%$. Видно, что отличия были хоть и достоверными, но небольшими, клетки THP-1r, как и THP-1s, оставались в клеточном цикле и пролиферировали. Пролиферация клеток THP-1r подтверждается экспрессией в них Ki-67 у $99 \pm 1\%$ клеток, как и у клеток THP-1s. В культуре THP-1r $96 \pm 4\%$ клеток оставались живыми, как и клетки THP-1s. Процент живых клеток в культурах THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов был таким же, как у THP-1s. Процент клеток THP-1 LPS в сравнении с THP-1s достоверно уменьшался в G₁/G₀-фазе, S-фазе ($p < 0.05$), но не в M-фазе и достоверно увеличился в G₂/M-фазе ($p \leq 0.02$), т.е. клетки оставались в клеточном цикле и пролиферировали. Процент клеток THP-1 ATRA в сравнении с THP-1s достоверно и значительно увеличивался в G₁/G₀-фазе ($p \leq 0.01$), уменьшался в S-фазе ($p \leq 0.01$) и не отличался достоверно в M- и G₂/M-фазах ($p > 0.05$) клеточного цикла, т.е. клетки оставались в клеточном цикле, пролиферировали, но дифференцировочный эффект ATRA частично подавлял пролиферацию.

Таким образом, в многоклеточных агрегатах *in vitro* значительно повышается резистентность клеток THP-1 к токсическому действию TRAIL на фоне сохранения их пролиферативной актив-

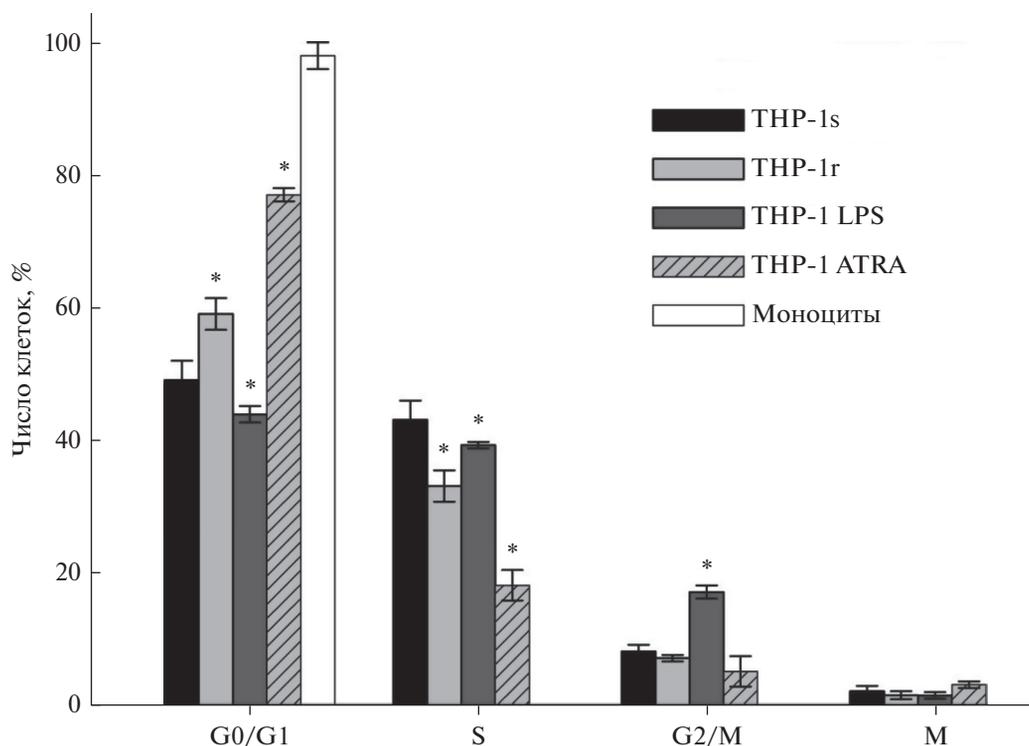


Рис. 2. Распределение по фазам клеточного цикла клеток THP-1s, THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов. По оси ординат – процент клеток, находящихся в отмеченной фазе. * $p < 0.05$ в сравнении с THP-1s.

ности, что также выявляется при воздействии на эти клетки факторов, способных вызывать провоспалительный фенотип (LPS) или монобластоподобную дифференцировку (ATRA). Полученные результаты дают основание предположить, что формирование TRAIL-резистентности клеток THP-1 в многоклеточных агрегатах сопряжено с приобретением ими провоспалительного фенотипа и признаков моноцитоподобной дифференцировки.

Исследование фенотипа клеток THP-1 в многоклеточных агрегатах *in vitro*

Для изучения изменений фенотипа клеток ОМЛ THP-1 в многоклеточных агрегатах THP-1r в сравнении с THP-1s выполняли анализ экспрессии кластеров дифференцировки (CD) этих клеток (иммунофенотипирование), оценивали их фагоцитарную активность, гранулярность цитоплазмы, а также продукцию внутриклеточного оксида азота (NO).

Имунофенотипирование TRAIL-чувствительных и TRAIL-резистентных клеток ОМЛ

Имунофенотипирование клеток проводили по 9 основным маркерам, характерным для моноцитарной дифференцировки и провоспалитель-

ного клеточного фенотипа [23, 24], таким как: интегрин αM (CD11b); интегрин αX (CD11c); ко-рецептора для липополисахарида (CD14); PTPRC (CD45); Fc- γ рецептор 1 (CD64); макросиалин (CD68); рецептор для гаптоглобина (CD163); толл-подобный рецептор 4 (CD284); МНС-II (HLA-DR). Созревание монобластов в моноциты характеризуется появлением и увеличением экспрессии таких рецепторов, как CD11b, HLA-DR, CD163, а также рецепторов CD14, CD284, CD64, CD68, необходимых для распознавания патогенных молекул и для фагоцитоза. В свою очередь, активация клеток моноцитарного ряда характеризуется появлением и увеличением экспрессии таких рецепторов, как CD11b, CD11c, ответственных за адгезию, HLA-DR и CD68 [25–27]. В табл. 1 представлены результаты иммунофенотипирования клеток THP-1s, THP-1r, THP-1 LPS, THP-1 ATRA и моноцитов.

Из табл. 1 видно, что у TRAIL-резистентных клеток THP-1r увеличен процент субпопуляций, несущих на поверхности CD68 и HLA-DR ($p \leq 0.01$), а также появились субпопуляции, несущие интегрин αM (CD11b) и интегрин αX (CD11c) ($24 \pm 1\%$ и $35 \pm 1\%$ соответственно) в сравнении с TRAIL-чувствительными клетками THP-1s через 24 ч после посева. У клеток THP-1 LPS, THP-1 ATRA и моноцитов были также выявлены популяции клеток, несущие интегрин αM

Таблица 1. Иммунофенотипирование TRAIL-чувствительных (THP-1s) и TRAIL-резистентных (THP-1r, THP-1 LPS и THP-1 ATRA) клеток THP-1 и моноцитов периферической крови человека

Маркер	Процент клеток популяции, экспрессирующих CD-маркеры				
	THP-1s	THP-1r	THP-1 LPS	THP-1 ATRA	моноциты
Интегрин α M, (CD11b)	0	24 \pm 1	74 \pm 3	88 \pm 1	93 \pm 1
Интегрин α X, (CD11c)	0	35 \pm 1	28 \pm 2	48 \pm 3	90 \pm 2
Ко-рецептор для LPS (CD14)	0	0	11 \pm 1	26 \pm 2	81 \pm 2
PTPRC (CD45)	96 \pm 1	97 \pm 2	99 \pm 1	99 \pm 1	99 \pm 1
Fc- γ рецептор 1 (CD64)	95 \pm 2	96 \pm 1	57 \pm 2	99 \pm 1	85 \pm 1
Макросиалин (CD68)	71 \pm 1	97 \pm 1	97 \pm 1	94 \pm 4	99 \pm 1
Рецептор для гаптоглобина (CD163)	0	0	0	0	75 \pm 1
TLR4 (CD284)	0	0	14 \pm 4	72 \pm 9	49 \pm 6
МНС II (HLA-DR)	21 \pm 1	58 \pm 2	69 \pm 3	53 \pm 5	73 \pm 1

Примечание. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение для трех независимых экспериментов.

(CD11b) и интегрин α X (CD11c), а также показан высокий процент клеток в популяции, экспрессирующих макросиалин (CD68) и МНС II (HLA-DR). В свою очередь, в популяции клеток THP-1r не было выявлено CD14 и CD284-положительных клеток, наличие которых было показано для популяции клеток THP-1 ATRA, моноцитов и THP-1 LPS, а также CD163-положительных клеток, наличие которых выявляется в популяции моноцитов (табл. 1).

В целом полученные результаты указывают, что клетки THP-1r приобретают некоторые иммунофенотипические признаки схожие с иммунофенотипом клеток THP-1 LPS, и клеток THP-1 дифференцированных посредством ATRA в моноцитоподобный фенотип.

Сравнительный анализ гранулярности в TRAIL-резистентных клетках THP-1r и в TRAIL-чувствительных клетках THP-1s

Известно, что дифференцировка монобластов в промоноциты и моноциты сопровождается изменением гранулярности их цитоплазмы [28, 29]. Для оценки гранулярности цитоплазмы клеток использовали показатель бокового светорассеяния (рассеяние света под прямым углом, SSC).

На рис. 3 видно, что значение интенсивности SSC у клеток THP-1r было ниже, чем у клеток THP-1s, как и у клеток THP-1 ATRA ($p < 0.01$), и достоверно не отличалась от таковой для моноцитов. Гранулярность клеток THP-1 LPS достоверно увеличилась в сравнении с THP-1s.

Таким образом, установлено, что гранулярность цитоплазмы клеток THP-1r уменьшалась относительно клеток THP-1s, как и у дифференцированных клеток THP-1 ATRA. В то же время гранулярность цитоплазмы клеток THP-1 LPS,

активированных провоспалительным агентом, возрастала в сравнении с THP-1s.

Сравнительный анализ фагоцитарной активности TRAIL-резистентных клеток THP-1r и TRAIL-чувствительных клеток THP-1s

Основная функция зрелых клеток моноцитарного ряда заключается в способности к фагоцитозу. Так, при созревании промоноцитов в моноциты, промоноциты начинают экспрессировать рецепторы, важные для распознавания патогенов и реализации фагоцитоза [30].

Обнаружили, что фагоцитарное число клеток THP-1r, культивируемых на агарозе 120 ч в составе многоклеточных агрегатов, не отличалось от фагоцитарного числа клеток THP-1s, культивируемых на пластике 24 ч, но было выше, чем у клеток THP-1 ATRA и THP-1 LPS (рис. 4а). Моноциты периферической крови обладали самым высоким показателем фагоцитарного числа. В свою очередь, относительный фагоцитарный индекс клеток THP-1r не отличался от фагоцитарного индекса клеток THP-1s и был достоверно ниже, чем у клеток THP-1 ATRA, моноцитов и клеток THP-1 LPS (рис. 4б).

Таким образом, показано, что фагоцитарная активность (фагоцитарный индекс и фагоцитарное число) клеток THP-1r в составе многоклеточных агрегатов, обладающих TRAIL-резистентным фенотипом, не изменялась относительно клеток THP-1s, чувствительных к действию *iz*TRAIL, и данные характеристики отличались от таковых для THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов, которые также обладали TRAIL-резистентным фенотипом. Следовательно, повышение TRAIL-резистентности клеток THP-1 в агрегатах происходит независимо от изменения фагоцитарной активности.

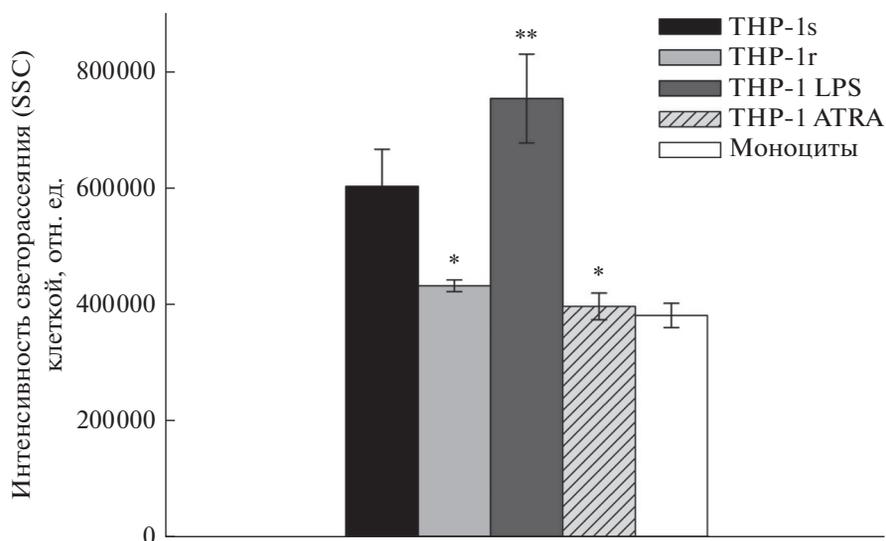


Рис. 3. Сравнительный анализ гранулярности клеток THP-1s, THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов. По оси ординат – среднее значение интенсивности бокового светорассеяния клеткой в отн. ед. (SSC). * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ в сравнении с THP-1s.

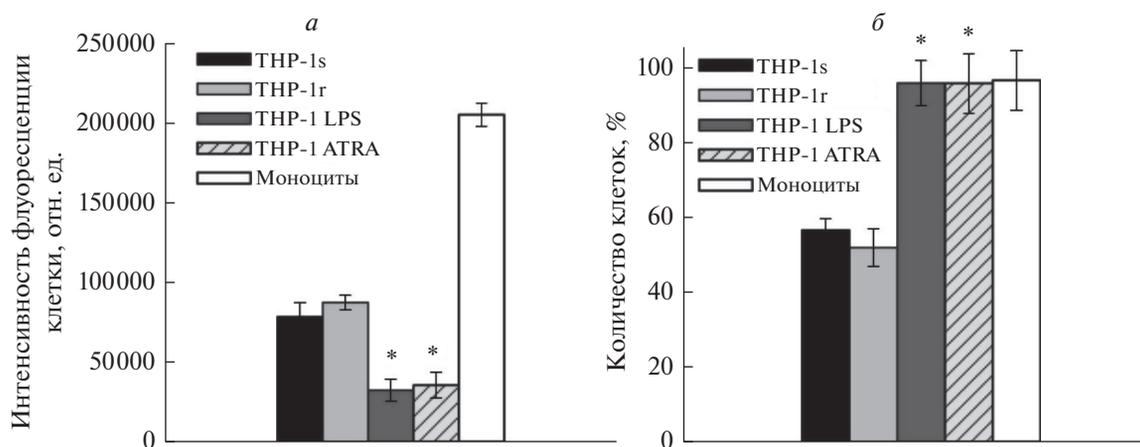


Рис. 4. Сравнительный анализ фагоцитарной активности клеток THP-1s, THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS и моноцитов. По оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции клетки (фагоцитарное число, *a*) и процент фагоцитирующих клеток (фагоцитарный индекс, *б*). Клетки фагоцитировали pHrodo Green *E. coli*. * $p < 0.01$ в сравнении с THP-1s.

Сравнительный анализ внутриклеточной продукции оксида азота у TRAIL-чувствительных и TRAIL-резистентных клеток ОМЛ in vitro

Известно, что оксид азота (NO) может способствовать индукции апоптоза в злокачественно трансформированных клетках или же сенсibilизировать их к действию противоопухолевых препаратов [31–33], а снижение продукции NO в опухолевых клетках может способствовать их лекарственной устойчивости [34].

Обнаружили, что, у клеток THP-1r происходило достоверное ($p < 0.01$) уменьшение уровня внутриклеточного NO в сравнении с клетками THP-1s, так же как у клеток THP-1 ATRA ($p < 0.01$)

и THP-1 LPS ($p < 0.05$). Для сравнения, уровень NO в моноцитах был близок к тому, что в клетках THP-1r и THP-1 ATRA (рис. 5).

Таким образом, приобретение TRAIL-резистентности клетками THP-1 (THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS) осуществлялось на фоне уменьшения внутриклеточного уровня NO в сравнении с клетками THP-1s, чувствительными к действию izTRAIL.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в работе результаты показали, что клетки ОМЛ THP-1 приобретают резистентность

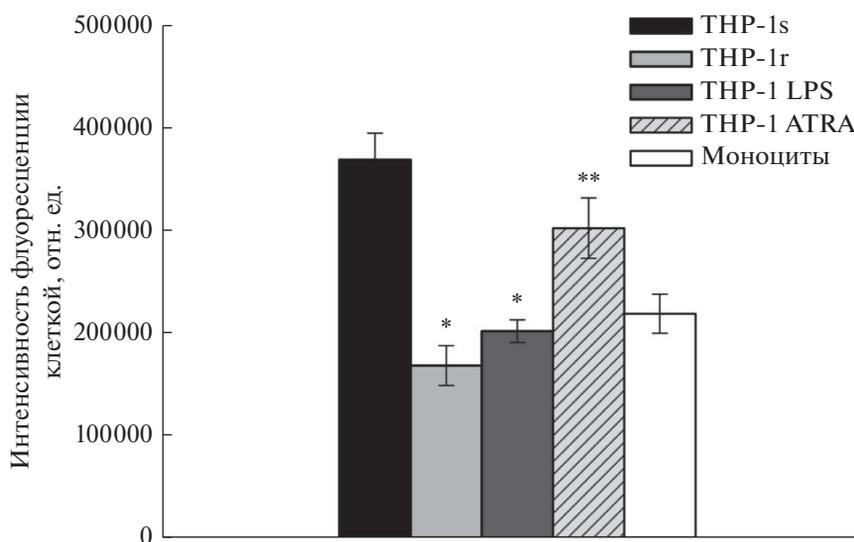


Рис. 5. Сравнительный анализ продукции оксида азота в клетках THP-1s, THP-1r, THP-1 ATRA, THP-1 LPS и в моноцитах. Клетки нагружали NO-зондом DAF-FM DA. По оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции клеток. * $p < 0.01$ и ** $p < 0.05$ в сравнении с THP-1s.

к TRAIL-опосредованной гибели в многоклеточных агрегатах *in vitro*, так же как после воздействия факторов, способных вызывать моноцитоподобную дифференцировку (ATRA) или провоспалительный фенотип (LPS), сохраняя при этом пролиферативную активность. Основываясь на этих данных, можно предположить, что формирование TRAIL-резистентности клеток THP-1 в многоклеточных агрегатах осуществляется по механизмам, сопряженным с моноцитоподобной дифференцировкой, с провоспалительной активацией. Возникает вопрос, каким образом культивирование клеток в составе агрегатов может приводить их к таким изменениям? Можно предположить, что изменение состояния клеток THP-1 в агрегатах связано с адгезивными и паракринными взаимодействиями, способными активировать внутриклеточные сигнальные пути. Существенная роль адгезивных взаимодействий в повышении TRAIL-резистентности клеток THP-1 в агрегатах вызывает сомнение, поскольку их адгезия слабая и агрегаты легко распадаются на отдельные клетки при слабом перемешивании среды. С другой стороны, не вызывает сомнения, что в агрегатах усиливается паракринное взаимодействие клеток, межклеточная сигнализация секретруемыми ими молекулами. Тот факт, что клетки в исследуемых агрегатах продолжали пролиферировать, говорит о достаточном для их роста поступлении в агрегаты низкомолекулярных компонентов питания, кислорода, об эффективном выходе из них низкомолекулярных метаболитов (лактат, аммоний и др.). Однако все это не исключает усиления в агрегатах межклеточной сигнализации секретруемыми цитокинами и

низкомолекулярными сигнальными молекулами, действующими на клеточные рецепторы, что могло вызвать у клеток THP-1 повышение TRAIL-резистентности и формирование некоторых признаков, характерных для моноцитоподобной дифференцировки и провоспалительной активации. Безусловно, можно говорить лишь о частичном совпадении изменений у клеток THP-1 в агрегатах с признаками дифференцировки или провоспалительной активации, и это хорошо видно по данным иммунофенотипирования клеток, по морфологическому признаку (гранулярность цитоплазмы), по функциональному признаку (фагоцитарная активность). Однако наличие некоторых совпадений, в том числе по уровню оксида азота может указывать на общие процессы в сравниваемых изменениях клеток THP-1, в частности, на необходимость повышения выживаемости клеток. Необходимость повышения выживаемости клеток в агрегатах *in vitro* связана с ограничениями диффузионного переноса компонентов питания и метаболитов в них, что ярко проявляется в сфероиде [35]. Такая же необходимость может возникать *in vivo* в связи с нарушениями кровообращения, что, по всей видимости, и сформировало у клеток такой адаптационный механизм.

Возникает вопрос, какое отношение феномен повышения TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в агрегатах *in vitro* может иметь к состоянию лейкозных клеток в костном мозге? В костном мозге клетки ОМЛ расположены близко друг к другу, т.е. в агрегированном состоянии. Воздействие химиотерапевтическими препаратами вызывает гибель клеток ОМЛ в периферической крови, а в

костном мозге значительная часть их остается живыми и определяет формирование рецидива. Поэтому изучение механизмов повышения резистентности клеток ОМЛ к повреждающим воздействиям, в частности TRAIL-резистентности в агрегатах *in vitro*, представляет интерес для разработки таргетных средств лечения лейкозов, подавления резистентности опухолевых клеток в костном мозге.

Наши результаты, в целом, указывают на то, что повышение TRAIL-резистентности клеток ОМЛ в агрегатах может быть сопряжено не только с путями активации, дифференцировки, способствующими повышению выживаемости клеток, но и с активацией иных путей выживаемости, на что указывает снижение продукции NO в клетке, которое, согласно литературным данным, может способствовать повышению резистентности опухолевых клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов (20-34-90062, 20-34-90061, 20-315-90014, 20-315-90101) и при финансовой поддержке стипендии Президента РФ (СП-606.2019.4, СП-608.2019.4, СП-1275.2019.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Захаров С.Г., Голенков А.К., Митина Т.А., Луцкая Т.Д., Белоусов К.А., Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Сенотов А.С., Акатов В.С. 2014. Повышение лекарственной устойчивости клеток острого миелобластного лейкоза в многоклеточных агрегатах *in vitro*. *Альманах клин. мед.* **31**, 11–16.
- Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Слядовский Д.А., Захаров С.Г., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Долгих Н.В., Голенков А.К., Акатов В.С. 2015. Клеточная агрегация повышает лекарственную устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза. *Биол. мембраны.* **32** (2), 125–134.
- Ishiguro T., Ohata H., Sato A., Yamawaki K., Enomoto T., Okamoto K. 2017. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* **108** (3), 283–289.
- Rodrigues T., Kundu B., Silva-Correia J., Kundu S.C., Oliveira J.M., Reis R.L., Corrello V.M. 2018. Emerging tumor spheroids technologies for 3D *in vitro* cancer modeling. *Pharmacol Ther.* **184**, 201–211.
- Riffle S., Pandey R.N., Albert M., Hegde R.S. 2017. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer.* **17** (1), E338.
- Hamilton G., Rath B. 2019. Applicability of tumor spheroids for *in vitro* chemosensitivity assays. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **15** (1), 15–23.
- Abe M., Havre P.A., Urasaki Y., Ohnuma K., Morimoto C., Dang L. H., Dang N. H. 2011. Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines. *BMC Cancer.* **11**, 1–10.
- Gonzalez-Mejia M.E., Doseff A.I. 2009. Regulation of monocytes and macrophages cell fate. *Front. Biosci. (Landmark Ed).* **14**, 2413–2431.
- Miranda M., Dyer K., Grandis J. Johnson D.E. 2003. Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: A requirement for Bcl-XL and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells. *Leukemia.* **17**, 390–400.
- Geissmann F., S. Jung, D. R. 2003. Littman: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* **19**, 71–82.
- Евстратова Я.В., Кобякова М.И., Новикова В.В., Сенотов А.С., Акатов В.С., Фадеев Р.С. 2019. Моноцитарно-макрофагальная дифференцировка подавляет экспрессию проапоптотических рецепторов к Apo2L/TRAIL и повышает резистентность к TRAIL-индуцированному апоптозу. *Биофизика.* **64** (5), 729–731.
- Konopleva M., Tabe Y., Zeng Z., Andreeff M. 2009. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: Mechanisms and approaches. *Drug Resist. Updat.* **12** (4–5), 103–113.
- Wilson K., Case M., Minto L., Bailey S., Bown N., Jesson J., Lawson S., Vormoor J., Irving J. 2010. Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemic stem cells defined by the immunophenotype, CD34+CD38lowCD19+ in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* **95** (4), 679–683.
- Konopleva M.Y., Jordan C.T. 2011. Leukemia stem cells and microenvironment: Biology and therapeutic targeting. *J. Clin. Oncol.* **29** (5), 591–599.
- Фадеев Р.С., Чеканов А.В., Долгих Н.В., Акатов В.С. 2012. Резистентность опухолевых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу в конфлюентных культурах. *Биол. мембраны.* **29** (6), 433–441.
- Fadeev R., Chekanov A., Solovieva M., Bezborodova O., Nemtsova E., Dolgikh N., Fadeeva I., Senotov A., Kobyakova M., Evstratova Y., Yakubovskaya R., Akatov V. 2019. Improved anticancer effect of recombinant protein iZTRAIL combined with sorafenib and peptide iRGD. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (3), E525.
- Tucureanu M.M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Deleanu M., Voicu G., Butoi E., Calin M., Manduteanu I. 2017. Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of Gi-protein inhibitor. *Int. J. Nanomedicine.* **13**, 63–76.
- Chanput W., Mes J., Vreeburg R.A.M., Savelkoul H.F.J., Wichers H.J. 2010. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation-modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct.* **1**, 254–261.
- Drach J., Lopez-Berestein G., Queen T., Andreeff M., Mehta K. 1993. Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Res.* **53** (9), 2100–2104.
- Фадеев Р.С., Соловьева М.Е., Слядовский Д.А., Захаров С.Г., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Голенков А.К., Акатов В.С. 2015. Ингибирование активации NF- κ B снижает устойчивость клеток острого

- миелоидного лейкоза к TRAIL-индуцированному апоптозу в многоклеточных агрегатах. *Биофизика*. **60** (6), 1146–1150.
21. Solovieva M.E., Soloviev V.V., Faskhutdinova A.A., Kudryavtsev A.A., Akatov V.S. 2007. Prooxidant and cytotoxic effect of N-acetylcysteine and glutathione in combination with vitamin B12b. *Cell and Tissue*. **1**, 40–49.
 22. Кобякова М.И., Евстратова Я.В., Сенотов А.С., Ломовский А.И., Новикова В.В., Краснов К.С., Фадеева И.С., Акатов В.С., Фадеев Р.С. 2020. Исследование макрофагальной дифференцировки клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах. *Биофизика*. **65** (2), 320–325.
 23. Gordon S., Taylor P.R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5** (12), 953–964.
 24. Kapellos T. S., Bonaguro L., Gemünd I., Reusch N., Saglam A., Hinkley E.R., Schultze J. L. 2019. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front. Immunol.* **10**, E2035.
 25. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J.M., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., K. Shortman, Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J. M., Lutz M. B. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. **116**, 74–80.
 26. Cifarelli V., Libman I.M., Deluca A., Becker D., Truccho M., Luppi P. 2007. Increased expression of monocyte CD11b (mac-1) in overweight recent-onset type 1 diabetic children. *Rev. Diabet. Stud.* **4** (2), 112–117.
 27. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C., Myasoedova V.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. 2017. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab. Investigation*. **97**, 4–13.
 28. Goldspink G. 1974. *Differentiation and Growth of Cells in Vertebrate Tissues*. 1st ed. London: Chapman and Hall Inc. 323 p.
 29. Paulette. 2009. Wintrobe's Clinical Hematology. *J. Am. Med. Assoc.* **302** (22), 2488–2493.
 30. Mukherjee R., Barman P.K., Thatoi P.K., Tripathy R., Das B.K., Ravindran B. 2015. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci. Rep.* **5**, E13886.
 31. Xie K., Huang S., Dong Z., Juang S.H., Gutman M., Xie Q.W., Nathan C., Fidler I.J. 1995. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J. Exp. Med.* **181**, 1333–1343.
 32. Xu L., Xie K., Fidler I.J. 1998. Therapy of human ovarian cancer by transfection with the murine interferon β gene: Role of macrophage-inducible nitric oxide synthase. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2699–2708.
 33. Qiu M., Chen L., Tan G., Ke L., Zhang S., Chen H., Liu J. 2015. A reactive oxygen species activation mechanism contributes to JS-K-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Sci. Rep.* **5**, E15104.
 34. Rapozzi V., Della P. E., Bonavida B. 2015. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. *Redox Biol.* **6**, 311–317.
 35. Lin R.Z., Chang H.Y. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol.* **3**, 1172–1184.

Appearance of Signs of Differentiation and Pro-inflammatory Phenotype in Acute Myeloid Leukemia Cells THP-1 with Cell Aggregation-Induced Increase of TRAIL Resistance *In Vitro*

M. I. Kobyakova¹, Ya. V. Evstratova¹, A. S. Senotov¹, A. I. Lomovsky¹, V. V. Minaichev¹,
A. I. Zvyagina¹, M. E. Solovieva¹, I. S. Fadeeva¹, V. S. Akatov¹, R. S. Fadeev¹, *

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

*e-mail: fadeevrs@gmail.com

Earlier we found that in multicellular aggregates of cultured acute myelogenous leukemia (AML) cells, mimicking *in vitro* the location of leukemic cells in the bone marrow, the resistance of cells to the TNF α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) increases significantly. In this work, we tried to assess whether an increase in the TRAIL resistance of AML THP-1 cells in multicellular aggregates *in vitro* is associated with triggering mechanisms mediated by cell differentiation or acquisition of the pro-inflammatory phenotype. The phenotype of THP-1 cells in aggregated and disaggregated cultures was compared with the phenotype of the disaggregated culture of THP-1 cells exposed to factors inducing monocyte-like differentiation or a pro-inflammatory phenotype. It was found that the increase in TRAIL resistance of aggregated THP-1 cells is accompanied by the appearance of signs characteristic of monocyte-like differentiation and a pro-inflammatory phenotype. The results are of interest for the development of the approaches to suppressing TRAIL resistance of AML cells in the human bone marrow.

Keywords: acute myelogenous leukemia, TRAIL resistance of tumor cells, multicellular aggregates *in vitro*, differentiation, pro-inflammatory phenotype