

ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ NF- κ B СНИЖАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ

© 2015 г. Р.С. Фадеев* **, М.Е. Соловьева*, Д.А. Слядовский* **,
С.Г. Захаров***, И.С. Фадеева*, А.С. Сенотов*,
А.К. Голенков***, В.С. Акатов* **

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Пуцинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пущино Московской области, пр. Науки, 5;

***Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского
(МОНИКИ), 129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2

E-mail: fadeevrs@gmail.com

Поступила в редакцию 23.09.15 г.

Исследовано снижение устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу при использовании низкомолекулярных ингибиторов активации транскрипционного фактора NF- κ B – NF- κ B Activation Inhibitor IV и JSH-23 – в нетоксичных концентрациях. Как NF- κ B Activation Inhibitor IV, так и JSH-23 эффективно снижали устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза человека в многоклеточных агрегатах к цитотоксическому действию рекомбинантного белка *iz*TRAIL. Показано, что применение данных ингибиторов приводило к снижению количества фосфорилированного белка RelA (p65) – основного маркера активации транскрипционного фактора NF- κ B. В работе обсуждается возможная причина повышения устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу и значение этого феномена для понимания лекарственной устойчивости лейкозных клеток в целом.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, рекомбинантный белок *iz*TRAIL, лекарственная устойчивость, многоклеточные агрегаты.

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) – злокачественная опухоль гемопоэтической системы, для которой характерно накопление аномальных (лейкозных) клеток, главным образом в костном мозге, и нарушение нормального гемопоэза [1]. Для ОМЛ характерно наличие соматических мутаций в мультипотентных гемопоэтических клетках или, в некоторых случаях, более дифференцированных клетках-предшественниках. Данные мутации приводят к более ускоренной пролиферации и активации антиапоптотических молекулярных путей по сравнению с нормальными клетками гемопоэтической паренхимы костного мозга [2]. Эффективность консервативной терапии ОМЛ колеблется от 20 до 45%, и одной из основных причин недостаточной эффективности медикаментоз-

ной терапии ОМЛ является лекарственная устойчивость лейкозных клеток [3]. Основную причину этого явления связывают в основном с приобретением устойчивости к препаратам при активации белков системы множественной лекарственной устойчивости, таких как Р-гликопротеид, MRP1-5 и BCRP [4]. Также в приобретении лекарственной устойчивости клеток ОМЛ важную роль играет микроокружение клеток в костном мозге. Элементы стромы костного мозга, такие как мезенхимальные стромальные клетки, а также внеклеточный матрикс, способствуют повышению устойчивости лейкозных клеток к индукции клеточной гибели [5]. Ранее нами было обнаружено, что у клеток ОМЛ человека в многоклеточных агрегатах происходит повышение устойчивости не только к действию низкомолекулярных веществ, таких как этопозид, сорафениб, но и к индукции рецептор-опосредованного апоптоза с помо-

Сокращение: ОМЛ – острый миелобластный лейкоз.

стью рекомбинантного белка izTRAIL [6]. Этот феномен вызывает интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения, поскольку применение рекомбинантных белков TRAIL (TNF alpha related apoptosis inducing ligand), инициирующих апоптотическую гибель опухолевых клеток и не повреждающих нормальные клетки человека, можно рассматривать как один из перспективных подходов в терапевтическом лечении онкологических заболеваний [7]. TRAIL индуцирует гибель опухолевых клеток, связываясь с рецепторами DR4 и DR5 на их поверхности, и поэтому его активность не связана с белками системы множественной лекарственной устойчивости [8]. В то же время способность клеток ОМЛ к приобретению устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу является потенциальным ограничением применения рекомбинантных белков TRAIL. В свою очередь, данный факт определяет актуальность изучения механизма устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу в многоклеточных агрегатах, а также поиска способов ее подавления.

Известно, что у клеток ОМЛ конститутивно повышена экспрессия провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли α [9]. В свою очередь, данные провоспалительные цитокины способны активировать фактор транскрипции NF- κ B, под транскрипционным контролем которого находятся антиапоптотические белки семейства Bcl-2 [10].

Таким образом, активация транскрипционного фактора NF- κ B может принимать непосредственное участие в реализации устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу. В представленной работе выясняли, могут ли известные низкомолекулярные ингибиторы активации транскрипционного фактора NF- κ B, используемые в нетоксичных концентрациях, подавлять устойчивость клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вещества. В работе использовали NF- κ B – NF- κ B Activation Inhibitor IV (Callbiochem, США), JSH-23 (Sigma-Aldrich, США), питательные среды RPMI-1640 и F-12 (Sigma-Aldrich, США), эмбриональную телячью сыворотку (Gibco, США), сульфат гентамицина (Sigma-Aldrich, США), метаболический индикатор AlamarBlue (Invitrogen, США).

Получение белка izTRAIL. Рекомбинантный белок izTRAIL человека получали по методике, описанной в работе [11].

Клеточные культуры. В работе использовали клетки ОМЛ человека линии ТНР-1, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI-1640/F-12 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки – полная ростовая среда, 40 мкг/мл гентамицина сульфата, при 37°C, в условиях CO₂ инкубатора (5% CO₂ в воздухе). При культивировании клетки линии ТНР-1 спонтанно формировали агрегаты, состоящие из 10–50 клеток.

Формирование многоклеточных агрегатов. Для формирования многоклеточных агрегатов клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты (Greiner, Германия), покрытые 1,5% раствором агарозы (Panreac, Испания) по 5·10³ клеток в лунку, в 100 мкл полной ростовой среды. Через 24 ч после посева в каждой лунке формировался единичный агрегат клеток.

Анализ жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности восстановления метаболического индикатора AlamarBlue. Для этого к клеткам после 24 ч инкубации с исследуемыми веществами добавляли AlamarBlue в концентрации 100 мкг/мл. Затем клетки инкубировали с красителем в течение 4 ч при 37°C и 5% содержания CO₂ в воздухе, измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны 595 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinity F200 (Tecan, Австрия). Выживаемость клеток оценивали по отношению результатов, полученных в опытных и контрольных (без добавления веществ) культурах, выраженному в процентах. Дополнительно цитотоксическое действие izTRAIL в комплексе с ингибиторами оценивали с помощью окрашивания клеток трипановым синим.

Анализ активации транскрипционного фактора NF- κ B. Уровень активации транскрипционного фактора NF- κ B определяли по уровню фосфорилированного RelA (p65) в клетках до и после инкубации с низкомолекулярными ингибиторами активации NF- κ B. Измерение уровня фосфорилированного RelA (p65) проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора NF κ B p65 (Total/Phospho) InstantOne™ ELISA (Ebioscience, США), в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка

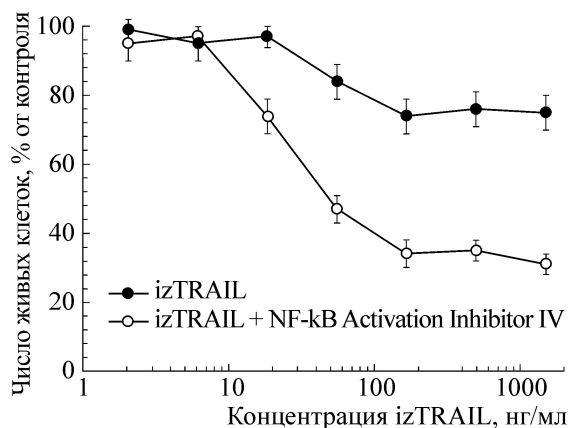


Рис. 1. Подавление устойчивости клеток ОМЛ человека ТНР-1 к рекомбинантному белку izTRAIL при применении низкомолекулярного ингибитора активации транскрипционного фактора NF-kB Activation Inhibitor IV в концентрации 50 нМ.

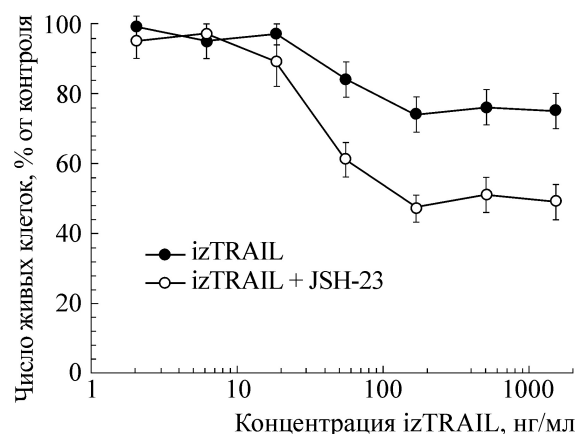


Рис. 2. Подавление устойчивости клеток ОМЛ человека ТНР-1 к рекомбинантному белку izTRAIL при применении низкомолекулярного ингибитора активации транскрипционного фактора JSH-23 в концентрации 100 нМ.

($M \pm SEM$). Цитотоксические опыты проводили не менее чем в 5 повторностях ($n \geq 5$). Твердофазный иммуоферментный анализ проводили не менее чем в 10 повторностях ($n \geq 10$). Статистическую значимость отличий определяли с использованием критерия Уилкоксона-Манна.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение устойчивости клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу при использовании низкомолекулярного ингибитора NF-kB activation inhibitor IV. На рис. 1 представлены данные о токсическом действии на клетки ОМЛ человека ТНР-1 рекомбинантного белка izTRAIL в сочетании с низкомолекулярным ингибитором активации транскрипционного фактора NF-kB – NF-kB Activation Inhibitor IV. NF-kB Activation Inhibitor IV был не токсичен для клеток в концентрациях до 250 ± 15 нМ. Из рисунка видно, что добавление NF-kB Activation Inhibitor IV в нетоксичной концентрации 50 нМ снижает устойчивость клеток ТНР-1 к цитотоксическому действию рекомбинантного белка izTRAIL в многоклеточных агрегатах.

В составе многоклеточного агрегата $78 \pm 5\%$ клеток были устойчивы к действию белка izTRAIL, добавление NF-kB Activation Inhibitor IV в концентрации 50 нМ снижало количество устойчивых к действию izTRAIL клеток до $35 \pm 4\%$. Величина полумаксимального ингибирования IC50 (концентрация вещества, при которой количество жизнеспособных клеток уменьшается на 50% относительно контрольных значений)

для izTRAIL в комбинации с NF-kB Activation Inhibitor IV составляла 41 ± 7 нг/мл (рис. 1). Таким образом, применение NF-kB Activation Inhibitor IV в нетоксичной концентрации уменьшает количество устойчивых клеток в составе многоклеточного агрегата к действию белка izTRAIL более чем в два раза и, тем самым, способствует снижению устойчивости клеток ОМЛ человека ТНР-1 к TRAIL-индуцированному апоптозу.

Снижение устойчивости клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу при использовании низкомолекулярного ингибитора JSH-23. На рис. 2 приводятся данные о токсическом действии рекомбинантного белка izTRAIL на клетки ТНР-1 в сочетании с низкомолекулярным ингибитором активации транскрипционного фактора NF-kB – JSH-23. JSH-23 был не токсичен для клеток в концентрациях до 400 ± 20 нМ. Применение ингибитора активации NF-kB JSH-23 в нетоксичной концентрации 100 нМ снижало устойчивость клеток ТНР-1 в составе многоклеточных агрегатов к цитотоксическому действию белка izTRAIL. Это выражалось в уменьшении числа клеток, устойчивых к действию белка izTRAIL, с $78 \pm 5\%$ до $51 \pm 5\%$ (рис. 2). Применение низкомолекулярного ингибитора активации транскрипционного фактора NF-kB JSH-23 снижало количество устойчивых клеток ТНР-1 в составе многоклеточных агрегатов к цитотоксическому действию белка izTRAIL. Однако снижение числа устойчивых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу при применении низкомолекулярного ингибитора JSH-23 было менее выражено ($51 \pm 5\%$), чем при ис-

пользовании ингибитора NF-kB Activation Inhibitor IV ($35 \pm 4\%$).

Снижение устойчивости клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу при использовании низкомолекулярных ингибиторов происходит на фоне ингибирования активации NF-kB. Показано, что при применении низкомолекулярных ингибиторов транскрипционного фактора NF-kB – JSH-23 и NF-kB Activation Inhibitor IV, происходит снижение уровня фосфорилированного RelA (p65) в клетках ТНР-1 в составе многоклеточных агрегатов (рис. 3). При применении ингибиторов NF-kB Activation Inhibitor IV и JSH-23 уровень фосфорилированного RelA (p65) был ниже уровня фосфорилированного RelA (p65) в клетках ТНР-1, необработанных данными низкомолекулярными ингибиторами (отличие достоверно, $p < 0,05$). Таким образом, уменьшение числа клеток ТНР-1, устойчивых к цитотоксическому действию белка *iz*TRAIL, в составе многоклеточных агрегатов происходит на фоне снижения уровня фосфорилированного RelA (p65), вызванного использованием ингибиторов транскрипционного фактора NF-kB. В свою очередь, уровень фосфорилированного RelA (p65) отражает уровень активации транскрипционного фактора NF-kB [12]. Представленные данные указывают на возможную роль транскрипционного фактора NF-kB в реализации устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах к TRAIL-индуцированному апоптозу. Для понимания значения полученных результатов для практической медицины необходимо дальнейшее исследование механизма лекарственной устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах *in vitro*.

Повышение лекарственной устойчивости опухолевых клеток в многоклеточных структурах (мультиклеточная устойчивость) становится одной из основных проблем, на решение которой направлены усилия современной противоопухолевой терапии [13–15]. Полученные в работе результаты показывают, что устойчивость клеток ОМЛ ТНР1 к TRAIL-индуцированному апоптозу в многоклеточных агрегатах может быть связана с активностью транскрипционного фактора NF-kB в клетках. В свою очередь, активация транскрипционного фактора NF-kB возможна при действии на клетки ОМЛ провоспалительных цитокинов, например интерлейкина-1 β , интерлейкина-6, интерлейкина-8, а также фактора некроза опухоли α , экспрессия которых известна для клеток ОМЛ [16]. Наряду с вышесказанным, в клетках ТНР-1 в составе многоклеточных агрегатов повышена экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 [17]. Функ-

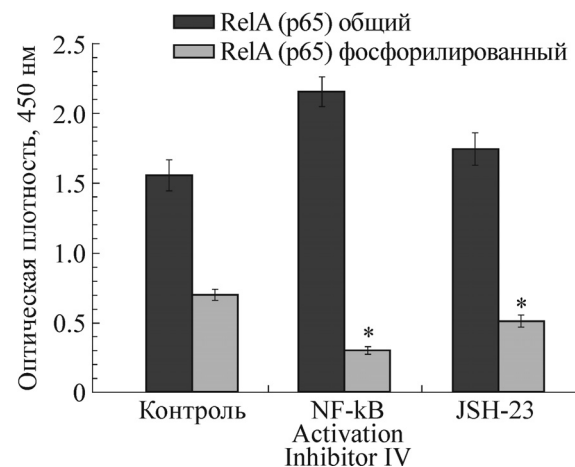


Рис. 3. Снижение уровня фосфорилированного RelA (p65) в клетках ТНР-1 в составе многоклеточных агрегатов при применении низкомолекулярных ингибиторов транскрипционного фактора NF-kB (JSH-23 и NF-kB Activation Inhibitor IV, в концентрации 100 нМ и 50 нМ соответственно).

ция данного белка состоит в ингибировании сборки апоптосомы за счет предотвращения выхода цитохрома *c* из митохондрий, а также связывания фактора, активирующего апоптоз – Araf-1, и его экспрессия находится под транскрипционным контролем NF-kB [18]. Таким образом, возникает предположение о непосредственном участии транскрипционного фактора NF-kB в реализации мультиклеточной устойчивости клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированному апоптозу. Учитывая тот факт, что основополагающие механизмы регуляции клеточных функций сходны как для условий *in vitro*, так и для условий *in vivo*, изучение роли транскрипционного фактора NF-kB в лекарственной устойчивости клеток ОМЛ представляет интерес для практической медицины. Также полученные в работе данные указывают на возможность регуляции мультиклеточной лекарственной устойчивости клеток ОМЛ с помощью низкомолекулярных ингибиторов активации транскрипционного фактора NF-kB.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-32183), стипендиального гранта Президента РФ (СП-6867.2013.4, СП-1519.2015.4), а также при непосредственной поддержке Правительства Российской Федерации (грант № 14.Z50.31.0028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Hoffman, *Hematology: basic principles and practice* (Elsevier Churchill Livingstone, NY., 2005).

2. G. Marcucci, T. Haferlach, and H. Döhner, *J. Clin. Oncol.* **29** (5), 475 (2011).
3. P. H. Wiernik, *Neoplastic Diseases of the Blood* (Springer Science + Business Media, NY., 2013).
4. C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, and P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer* **13** (10), 714 (2013).
5. М. Коноплева, Y. Tabe, and M. Andreeff, *Drug Resist. Updat.* **12** (4–5), 103 (2009).
6. С. Г. Захаров, А. К. Голенков, Т. А. Митина и др., *Альманах клин. медицины* **31**, 11 (2014).
7. T. Newsom-Davis, S. Prieske, and H. Walczak, *Apoptosis* **14**, 607 (2009).
8. A. Ashkenazi and R. S. Herbst, *J. Clin. Invest.* **118**, 1979 (2008).
9. H. Sugiyama, K. Inoue, and T. Kishimoto, *The Leuk. Lymphoma* **21** (1–2), 49 (1996).
10. S. Takahashi, H. Harigae, and M. Kaku, *Leuk. Res.* **29** (8), 893 (2005).
11. Р. С. Фадеев, А. В. Чеканов, Н. В. Долгих, и др., *Биол. мембраны: Журн. мембранной и клеточной биологии* **29** (6), 433 (2012).
12. A. Oeckinghaus and S. Ghosh, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **1** (4), a000034 (2009).
13. R. S. Fadeev, A. V. Chekanov, and V. S. Akatov, *Biofizika* **57** (4), 649 (2012).
14. D. Barbone, P. Cheung, and V. C. Broaddus, *PLoS One* **7** (12), e52753 (2012).
15. I. Dufau, C. Frongia, and A. Valette, *BMC Cancer* **12** (15), (2012).
16. F. Westermann, D. Kube, and H. Tesch, *Ann. Oncol.* **7** (4), 397 (1996).
17. Р. С. Фадеев, М. Е. Соловьева, Д. А. Слядовский и др., *Биол. мембраны: Журн. мембранной и клеточной биологии* **32** (2), 125 (2015).
18. J. Lindsay, M. D. Esposti, and A. P. Gilmore, *Biochim. Biophys. Acta* **1813** (4), 532 (2011).

Inhibition of NF- κ B Activation Decreases Resistance in Acute Myeloid Leukemia Cells to TRAIL-induced Apoptosis in Multicellular Aggregates

R.S. Fadeev* **, M.E. Solovieva*, D.A. Slyadovskiy* **, S.G. Zakharov*,
I.S. Fadeeva*, A.S. Senotov*, A.K. Golenkov***, and V.S. Akatov* ****

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Pushchino State Natural Science Institute, prosp. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, ul. Shchepkina 61/2, Moscow, 129110 Russia*

Suppression of resistance in acute myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis in multicellular aggregates, was studied using small molecule inhibitors of the activation of the transcription factor NF- κ B – NF- κ B Activation Inhibitor IV and JSH-23 at non-toxic concentrations. NF- κ B Activation Inhibitor IV and JSH-23 reduced resistance in the acute myeloid leukemia cells in multicellular aggregates to cytotoxic action of recombinant protein izTRAIL. It is shown that the use of these inhibitors decreased the phosphorylation of the RelA (p65) as a main marker activation of the transcription factor NF- κ B. We discuss a possible reason for increasing resistance in acute myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis in multicellular aggregates.

Key words: acute myeloid leukemia, recombinant protein izTRAIL, drug resistance, multicellular aggregates