

ИССЛЕДОВАНИЕ МАКРОФАГАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ

© 2020 г. М.И. Кобякова*, Я.В. Евстратова*, А.С. Сенотов*, А.И. Ломовский*,
В.В. Новикова*, К.С. Краснов**, И.С. Фадеева*, В.С. Акатов*, Р.С. Фадеев*

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

**Тульский государственный университет, 300012, Тула, просп. Ленина, 92

E-mail: ritaaaaa49@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 31.01.2020 г.

Главной причиной недостаточной эффективности терапии острого миелоидного лейкоза является возникновение устойчивости лейкозными клетками к действию химиотерапевтических препаратов. Факторы микроокружения играют одну из ключевых ролей в формировании фенотипа лекарственной устойчивости лейкозных клеток. Выяснение механизмов лекарственной устойчивости, опосредованной условиями микроокружения, важно для идентификации новых фармакологических мишеней консервативной терапии направленного действия. Нами было проведено исследование роли дифференцировки в макрофагальном направлении в повышении лекарственной устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах. Показано, что в многоклеточных агрегатах не происходит созревания в макрофагальном направлении. Эти данные указывают на участие других механизмов в повышении лекарственной устойчивости в многоклеточных агрегатах клеток острого миелоидного лейкоза.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, лекарственная устойчивость, многоклеточные агрегаты, межклеточная адгезия, дифференцировка.

DOI: 10.31857/S0006302920020143

Острый миелоидный лейкоз — злокачественная опухоль гемопоэтической системы, которая характеризуется накоплением аномальных (лейкозных) бластных клеток, главным образом, в костном мозге и нарушением нормального гемопоэза и иммунитета [1]. Эффективность консервативной терапии острого миелоидного лейкоза колеблется от 20 до 45% [2]. Одной из основных причин недостаточной эффективности терапии острых форм миелоидного лейкоза является возникновение первичной лекарственной устойчивости у лейкозных клеток. Главной причиной возникновения данного типа устойчивости считается взаимодействие клеток лейкоза с элементами их микроокружения в патологически измененном костном мозге, например, с мезенхимальными стромальными клетками или внеклеточным матриксом [3, 4]. Ранее нами было

обнаружено [5, 6], что не только контакты с элементами стромы костного мозга могут способствовать формированию первичной лекарственной устойчивости у лейкозных клеток; контакты только между лейкозными клетками (гомотипические взаимодействия), которые возникают при образовании многоклеточных агрегатов, также могут приводить к выраженному повышению устойчивости к индукции клеточной гибели. Выяснение механизмов лекарственной устойчивости, опосредованной условиями микроокружения, важно для выявления новых фармакологических мишеней консервативной терапии направленного действия. Одной из возможных причин повышения лекарственной устойчивости в многоклеточных агрегатах может являться созревание (дифференцировка) клеток острого миелоидного лейкоза в макрофагальном направлении [7–9]. Так, повышение лекарственной устойчивости при созревании в макрофагальном направлении может быть связано с увеличением экспрессии антиапоптотического белка FLIP, ко-

Сокращения: CD — кластеры дифференцировки, ЛПС — липополисахарид, ФНО — фактор некроза опухоли, ИЛ — интерлейкин.

торый является ингибитором активации каспазы 8, увеличением экспрессии антиапоптотического белка XIAP, а также с активацией транскрипционного фактора NF-κB и PI3K/Akt сигнального каскада [10–12].

В связи с этим в данном исследовании нами было проведено изучение степени созревания (дифференцировки) в макрофагальном направлении клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования в работе использовали клетки острого миелоидного лейкоза человека ТНР-1, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки ТНР-1 культивировали в среде RPMI 1640/F12 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 80 мкг/мл гентамицина, 24 мкг/мл флуконазола при 37°C в условиях 5%-го содержания CO₂ в воздухе.

Для формирования многоклеточных агрегатов клетки высевали по 5 · 10³ клеток в лунку в 100 мкл полной ростовой среды в 96-луночные планшеты, покрытые 1.5%-м раствором агарозы (Panreas, Испания) и культивировали в течение пяти суток (120 ч). В контрольных условиях клетки ТНР-1 высевали по 5 · 10³ клеток в лунку в 100 мкл полной ростовой среды в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч. Через 24 ч культивирования многоклеточные агрегаты отсутствовали.

Макрофагоподобные клетки получали с помощью обработки форболовым эфиром форбол-12-миристан-13-ацетатом, известным индуктором макрофагальной дифференцировки. Для этого клетки ТНР-1 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии 200 нМ форбол-12-миристан-13-ацетата (Sigma, США) в течение 96 ч. Затем клетки трижды отмывали средой DMEM/F12 и использовали для экспериментов. Для открепления клеток от поверхности культуральных флаконов использовали Accutase (Sigma, США).

Имунофенотипирование клеток. Для исследования экспрессии моноцитарно-макрофагальных маркеров (кластеров дифференцировки – CD) на поверхности клеток ТНР-1 через 24 и 120 ч инкубации клетки собирали с 96-луночных планшетов, отмывали в Cell Staining Buffer (Biolegend, США), при 300 g в течение 5 мин. Окрашивание проводили с использованием панели моноклональных антител APC Anti-human CD11b (Biolegend, США), FITC Anti-human CD14 (Sigma, США), FITC Anti-human PTPRC (Sigma,

США), FITC Mouse Anti-Human CD163 (BD Bioscience, США), FITC Anti-Human CD68 (BD Bioscience, США), контрольные клетки окрашивали APC Mouse IgG1, k isotype Ctrl (Biolegend, США) или FITC Mouse IgG1, k isotype Ctrl (Biolegend, США) соответственно. Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После окрашивания клетки фиксировали 2%-м раствором параформальдегида (Panreas, Испания). Определение проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, США).

Оценка относительного количества митохондрий и лизосом. Для оценки относительного количества митохондрий и лизосом у клеток ТНР-1 после 24 и 120 ч культивирования клетки окрашивали 100 нМ MitoTracker Green FM (Thermo Fisher Scientific, Германия) и 75 нМ LysoTracker Green DND-26 (Thermo Fisher Scientific, Германия) соответственно. Инкубировали в течение 30 мин в условиях CO₂-инкубатора. Определение проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6.

Анализ фагоцитарной активности клеток. Для определения фагоцитарной активности клеток ТНР-1 после 24 и 120 ч культивирования к клеткам добавляли 1 мг/мл pHrodo Green *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, Германия), инкубировали в течение 2 ч в условиях CO₂-инкубатора. В качестве контроля неспецифического окрашивания клетки инкубировали с 10 мкг/мл цитохалазина Д (Sigma, США), в течение 30 мин в условиях CO₂-инкубатора, затем добавляли 1 мг/мл pHrodo Green *E. coli* и инкубировали в течение 2 ч. Определение проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6.

Оценка внутриклеточной продукции NO. Для оценки внутриклеточной продукции NO после 24 и 120 ч культивирования клетки окрашивали 5 мкМ DAF-FM DA (Thermo Fisher Scientific, Германия), инкубировали в течение 40 мин в условиях CO₂-инкубатора. Далее клетки отмывали в полной ростовой среде (300 g, 5 мин) и инкубировали в ней в течение 30 мин в условиях CO₂-инкубатора. Для определения индуцибельной продукции NO клетки прединкубировали с 10 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) в течение 24 ч. Определение проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6.

Анализ индуцированной липополисахаридами секреции цитокинов. Для определения ЛПС-индуцированной секреции фактора некроза опухоли (ФНО-α), интерлейкинов ИЛ-1β и ИЛ-6 клетками ТНР-1, клетки инкубировали с 10 мкг/мл ЛПС из *E. coli* O111:B4 (Sigma, США) в течение 24 ч. После инкубации клетки собирали с 96-луночных планшетов, центрифугировали (300 g, 5 мин), для

Анализ экспрессии моноцитарно-макрофагальных маркеров у клеток ТНР-1

Маркеры	Интегрин альфа-М (CD11b)	Корцептор для ЛПС (CD14)	PTPRC (CD45)	Макросиалин (CD68)	Рецептор для гаптоглобина (CD163)
Контроль	—	—	96.0 ± 3.0%	71.0 ± 3.0%	—
Многочлечный агрегат	24.0 ± 1.0%	—	97.0 ± 1.0%	97.0 ± 1.0%	—
Клетки, обработанные форбол-12-миристан-13-ацетатом	7.1 ± 0.1%	95.1 ± 0.3%	99.0 ± 0.4%	6.0 ± 2.0%	—

анализа использовали надосадочную жидкость. Оценку секреции ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 проводили с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа «Интерлейкин-1бета-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» и «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» («Вектор Бест», Россия) согласно указаниям производителя. Оптическую плотность определяли при длине волны 450 нм, используя планшетный ридер Imark (Bio-Rad, США).

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в трех повторениях ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с использованием дисперсионного анализа (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки созревания клеток ТНР-1 в макрофагальном направлении проводили анализ экспрессии клеточных маркеров CD11b, CD14, CD45, CD68, CD163; оценивали относительное количество митохондрий, лизосом и продукцию внутриклеточного оксида азота (NO); определяли фагоцитарную активность, а также ЛПС-индуцированную секрецию ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6. Сравнение проводили относительно клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (форбол-12-миристан-13-ацетатом).

Показано, что для клеток ТНР-1 характерна конститутивная экспрессия РТПРС (CD45) и макросиалина (CD68). В то же время в многочисленных агрегатах появлялось $24 \pm 1\%$ интегрин альфа-М (CD11b)-положительных клеток и число макросиалин (CD68)-клеток составляло $97 \pm 1\%$, что достоверно отличается от контроля ($P \leq 0.001$) (таблица). Для клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром, характерна экспрессия практически у всех клеток корцептора для ЛПС (CD14) и практически полное отсутствие клеток, несущих маркер CD68.

При оценке ЛПС-индуцированной секреции ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α для клеток в многочис-

точных агрегатах выявлено достоверное ($P < 0.05$) увеличение ИЛ-1 β (рис. 1а), но не ИЛ-6 (рис. 1б) и ФНО- α (рис. 1в) относительно контрольных клеток. У клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром, показана высокая ЛПС-индуцированная секреция всех представленных цитокинов (рис. 1).

Также было показано, что у клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах происходит повышение ЛПС-индуцированной продукции внутриклеточного оксида азота, что не характерно для клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (рис. 2).

Далее мы показали, что у клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах относительное количество митохондрий достоверно выше (рис. 3а), чем у клеток ТНР-1 в контроле ($P \leq 0.005$) и у клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром ($P < 0.05$). В то же время относительное количество лизосом у клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах не отличалось от относительного количества лизосом у контрольных клеток и было меньше, чем у клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (рис. 3б).

Также было проведено исследование фагоцитарной активности клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах. Было показано, что относительное фагоцитарное число клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах не отличалось от фагоцитарного числа клеток в контроле и было ниже, чем у клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (рис. 4а). Однако фагоцитарный индекс клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах не отличался от фагоцитарного индекса клеток в контроле и клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (рис. 4б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было показано, что в многочисленных агрегатах, образованных клетками ТНР-1, наблюдается появление альфа-М-интегрин (CD11b)-положительных клеток и увеличивается число макросиалин (CD68)-положительных кле-

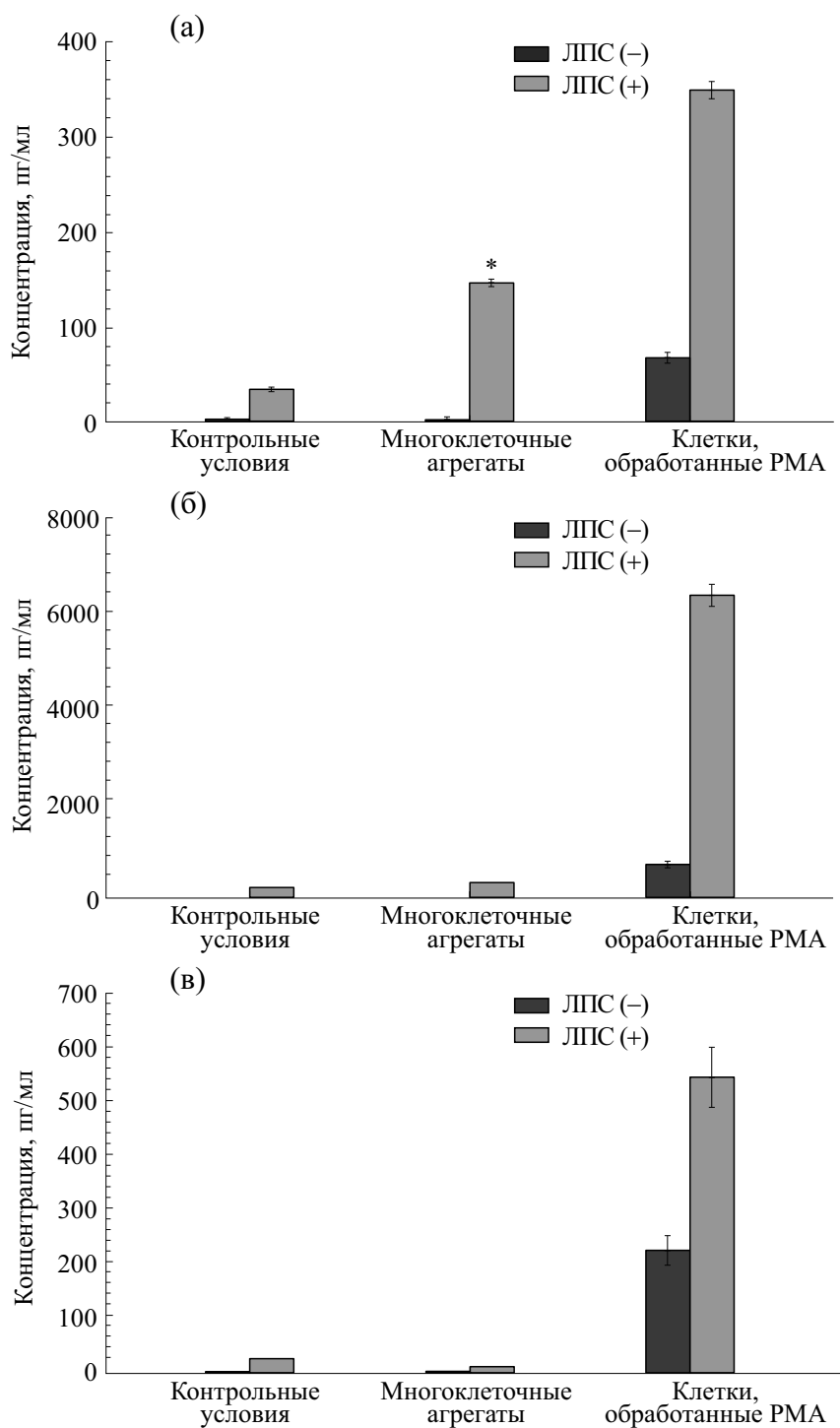


Рис. 1. ЛПС-индуцированная секреция ИЛ-1 β (а), ИЛ-6 (б) и ФНО- α (в) клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах.

ток, отсутствие ЛПС-индуцированной секреции ИЛ-6 и ФНО- α , увеличение ЛПС-индуцированной продукции внутриклеточного оксида азота, увеличение относительного количества митохондрий, что не характерно для клеток ТНР-1, обра-

ботанных форболовым эфиром, стандартным агентом макрофагальной дифференцировки.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что у клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах не происходит созревания в макрофагальном на-

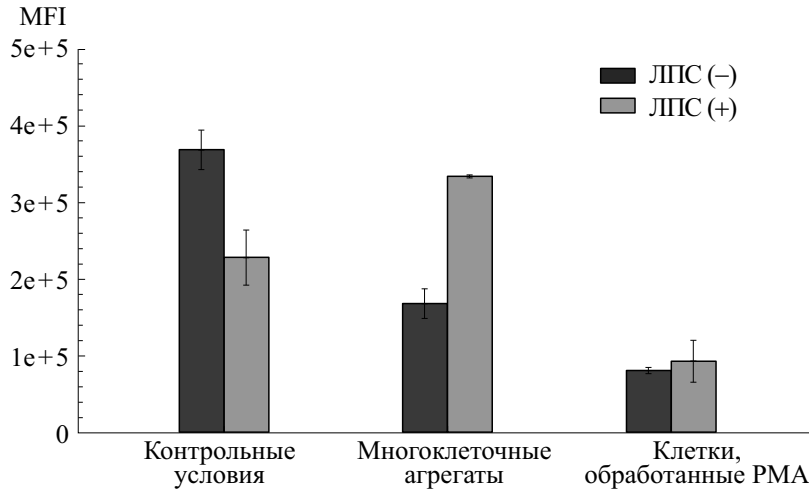


Рис. 2. Продукция внутриклеточного NO клетками ТНР-1 в многоклеточных агрегатах.

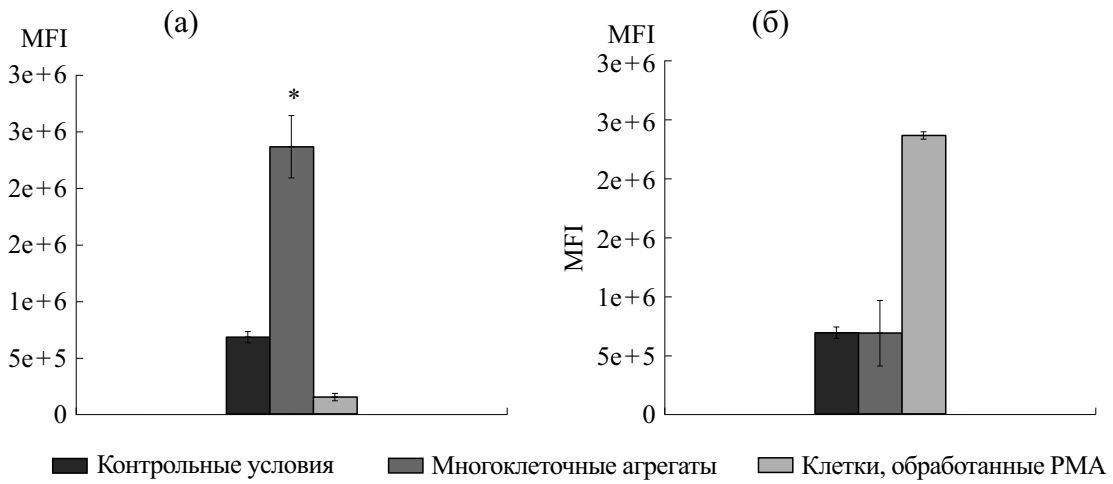


Рис. 3. Относительное количество митохондрий (а) и лизосом (б) у клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах.

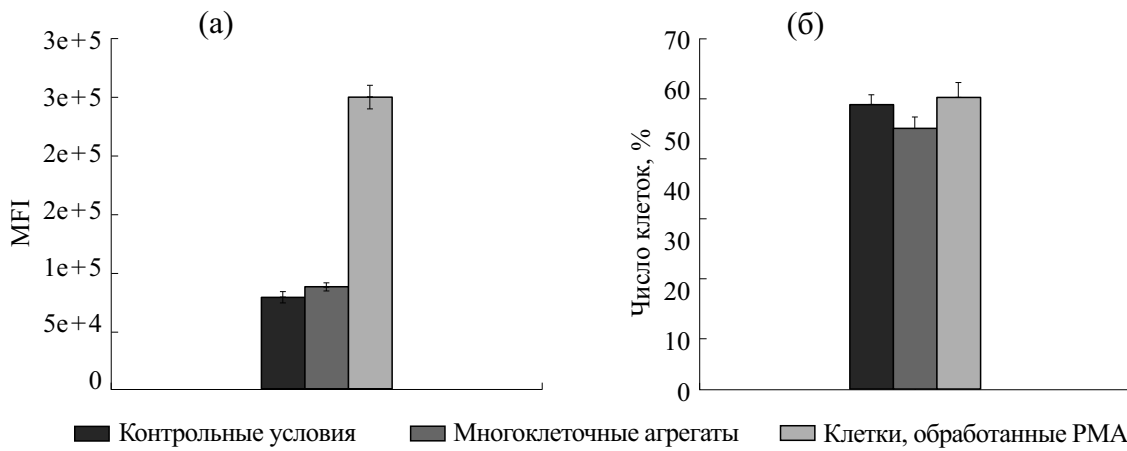


Рис. 4. Фагоцитарная активность клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах: относительное фагоцитозное число (а) и фагоцитозный индекс (б).

правлении и повышение лекарственной устойчивости связано с другими механизмами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Hoffman, B. Furie, P. McGlave, et al., *Hematology: Basic Principles and Practice*, 4th ed. (Churchill Livingstone Elsevier., 2005).
2. G. Marcucci, T. Haferlach, and H. Döhner, *Clin. Oncol. J.* **29** (5), 475 (2011).
3. S. Maier, C. Dahlstroem, C. Haefliger, and A. Plum, *Am. Pharmacogenom. J.* **5**, 223 (2005).
4. S. T. Taylor, J. A. Hickman, and C. Dive, *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 18 (2000).
5. С. Г. Захаров, А. К. Голенков, Т. А. Митина и др., *Альманах клин. медицины* **31**, 11 (2014).
6. Р. С. Фадеев, М. Е. Соловьева, Д. А. Слядовский и др., *Биол. мембраны: Журн. мембранной и клеточной биологии* **32** (2), 125 (2015).
7. Я. В. Евстратова, М. И. Кобякова, В. В. Новикова и др., *Биофизика* **64** (5), 729 (2019).
8. T. Oda, K. Hirota, K. Nishi, and R. Nohara, *Am. Physiol. Cell Physiol. J.* **291** (1), 104 (2006).
9. M. Daigneault, J. A. Preston, H. M. Marriott, et al., *PLoS One* **5** (1), e8668 (2010).
10. L. J. Pagliari, H. Perlman, H. Liu, and R. M. Pope, *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8855 (2000).
11. Y. Ma, V. Temkin, H. Liu, R. M. Pope, *J. Biol. Chem.* **280** (51), 41827 (2005).
12. H. Liu, H. Perlman, L. J. Pagliari, and R. M. Pope, *J. Exp. Med.* **194**, 113 (2001).

The Study of Macrophage Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells in Multicellular Aggregates

M.I. Kobyakova*, Ya.V. Evstratova*, A.S. Senotov*, A.I. Lomovsky*, V.V. Novikova*, K.S. Krasnov**, I.S. Fadeeva*, V.S. Akatov*, and R.S. Fadeev*

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

***Tula State University, prosp. Lenina 92, Tula, 300012 Russia*

The main reason of insufficient efficacy in treatment of acute myeloid leukemia is the emergence of leukemic cells resistant to the action of chemotherapeutic drugs. Microenvironment factors play one of the key roles in the formation of the phenotype of drug resistance of leukemia cells. Elucidating mechanisms of drug resistance mediated by microenvironment conditions is important in order to identify new pharmacological targets for conservative directed therapy. We have studied the role of differentiation in the macrophage direction in increasing the drug resistance of acute myeloid leukemia cells in multicellular aggregates. It was shown that in multicellular aggregates no maturation occurs in the macrophage direction. These data indicate that other mechanisms contribute to an increased drug resistance in multicellular aggregates of acute myeloid leukemia cells.

Keywords: acute myeloid leukemia, drug resistance, multicellular aggregates, intercellular adhesion, differentiation