

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-329

**ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ПОДАВЛЯЕТ TRAIL-ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ  
КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА \*****PROINFLAMMATORY ACTIVATION SUPPRESSES TRAIL-INDUCED APOPTOSIS  
OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS**М. И. Кобякова<sup>1,2</sup>, А. С. Сенотов<sup>2</sup>, Я. В. Ломовская<sup>2</sup>, К. С. Краснов<sup>2</sup>, Е. И. Фетисова<sup>2</sup>, Р. С. Фадеев<sup>2</sup><sup>1</sup>НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ПушchinoM. I. Kobyakova<sup>1,2</sup>, A. S. Senotov<sup>2</sup>, Ya. V. Lomovskaya<sup>2</sup>, K. S. Krasnov<sup>2</sup>, E. I. Fetisova<sup>2</sup>, R. S. Fadeev<sup>2</sup><sup>1</sup>Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk<sup>2</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino

✉ kobyakovami@gmail.com

**Аннотация**

Исследование механизмов резистентности клеток ОМЛ к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета остается крайне актуальной задачей. В работе описан новый механизм TRAIL-резистентности клеток ОМЛ, основанный на провоспалительной клеточной активации, сопровождающейся изменением поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов, содержания адапторного белка FADD и антиапоптотических факторов cFLIPS, Livin и cIAP2.

**Abstract**

The study of the mechanisms of resistance of AML cells to the action of antitumor immunity mediators remains an extremely urgent task. The paper describes a new mechanism of TRAIL resistance of AML cells based on proinflammatory cellular activation accompanied by changes in the surface expression of proapoptotic TRAIL receptors, the content of the FADD adaptive protein and antiapoptotic factors cFLIPS, Livin and cIAP2.

Ранее в наших работах было показано повышение устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) к TRAIL-индуцированной гибели при их ЛПС-зависимой провоспалительной активации и *in vitro* модели ЛПС-независимой провоспалительной активации — в долговременной культуре клеток высокой плотности. Известно, что нарушение регуляции гуморальных медиаторов воспаления при ОМЛ может создавать микроокружение, активирующее пролиферацию, выживаемость и лекарственную устойчивость лейкозных клеток. Также хорошо известно, что провоспалительные цитокины и ростовые факторы могут повышать устойчивость клеток ОМЛ к клеточной гибели за счет активации воспалительных сигнальных путей, регулирующих внутриклеточное содержание антиапоптотических белков. В тоже время механизмы резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели, опосредованные воспалением, остаются неизвестными.

В данной работе исследовали влияние провоспалительной активации клеток ОМЛ на активацию внутриклеточного проапоптотического сигнального пути TRAIL.

В работе использовали клетки острого миелоидного лейкоза человека линии ТНР-1 (АТСС, США), которые культивировали в питательной среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Клетки высевали по  $5 \times 10^4$  кл/мл в лунки U-образного 96-луночного культурального планшета. Через 1 сутки после посева количество клеток в лунке увеличивалось до  $1 \times 10^5$  кл/мл, и мы использовали их как культуры низкой плотности (ТНР-1НПК). Через 5 суток культивирования без смены питательной среды количество клеток в лунке выросло до  $1 \times 10^6$  кл/мл, формируя трехмерный многоклеточный агрегат — высокоплотную клеточную культуру (ТНР-1ВПК). Для активации провоспалительного фенотипа (ТНР-1ЛПС) клетки ТНР-1 обрабатывали 10 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) из *E. Coli* O111:B4 (Sigma, США) в течение 24 часов. Анализ поверхностной экспрессии рецепторов к TRAIL и содержания cleaved PARP1/2 проводили методом проточной цитометрии на приборе BD Accuri C6 (BD Bioscience, США) с использованием соответствующих моноклональных антител. Анализ ферментативной активности каспазы-3 проводили с помощью коммерческого набора Caspase-3 Activity Assay Kit (Cell Signaling Technology, США) на спектрофотометре Infinite F200

\* Работа выполнена в рамках государственного задания № FWNR-2022-0001.

© М. И. Кобякова, А. С. Сенотов, Я. В. Ломовская, К. С. Краснов, Е. И. Фетисова, Р. С. Фадеев, 2024

(Tecan, Швейцария). Содержание белков FADD, cFLIP, прокаспазы и каспазы 8, Bid и tBid в клетках определяли методом вестерн-блота. Уровень экспрессии мРНК генов белков NAIP, BIRC2, BIRC3, XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BIRC8 определяли методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Результаты представляли в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение. Опыты проводили не менее чем в трех повторах. Статистическую значимость отличия определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма — Сидака.

Анализ экспрессии проапоптотических рецепторов показал снижение числа клеток, несущих TRAIL-R1 и TRAIL-R2, в культуре TRAIL-резистентных клеток ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС, обладающих провоспалительным фенотипом, по сравнению с чувствительными к действию TRAIL неактивированными клетками ТНР-1НПК. Для клеток ТНР-1ВПК также было выявлено снижение поверхностной экспрессии TRAIL-R1. При исследовании активации внутриклеточного проапоптотического сигнального пути TRAIL было выявлено снижение содержания активной каспазы 8 в клетках ТНР-1ВПК и ТНР-1ЛПС на фоне снижения содержания белка FADD, а также повышения содержания cFLIPS и прокаспазы 8 по сравнению с клетками ТНР-1НПК. Также было показано, что в клетках ТНР-1ВПК после обработки izTRAIL существенно ниже ферментативная активность каспазы 3, содержание tBid и число клеток, содержащих cleaved PARP1/2, а также повышался уровень экспрессии гена белка Livin в сравнении с клетками ТНР-1НПК. В свою очередь, в клетках ТНР-1ЛПС после обработки izTRAIL мы не обнаружили tBid, cleaved PARP1/2 и изменений в ферментативной активности каспазы 3, однако выявили повышение уровня экспрессии гена белка cIAP2 относительно клеток ТНР-1НПК.

Таким образом, представленные результаты указывают на то, что повышение резистентности к TRAIL-индуцированной гибели у клеток ОМЛ ТНР-1 при их провоспалительной активации может реализоваться через снижение поверхностной экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов, содержания адапторного белка FADD, а также повышение содержания антиапоптотического фактора cFLIPS и представителей семейства IAPs — Livin и cIAP2. Результаты этой статьи открывают новые представления о роли воспаления в формировании устойчивости клеток ОМЛ к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета, в частности, TRAIL.