

Роль гипоксического фенотипа в повышение лекарственной устойчивости клеток ОМЛ в многоклеточных структурах.

Научный руководитель – Фадеев Роман Сергеевич

Кобякова Маргарита Игоревна

Аспирант

Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино, Россия

E-mail: ritaaaaa49@gmail.com

Ранее в наших работах было показано, что в многоклеточных структурах формируется устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) к действию химиотерапевтических препаратов. В настоящее время механизмы данного явления остаются не изученными. Известно, что приобретение гипоксического фенотипа может способствовать повышению устойчивости лейкозных клеток к действию химиотерапевтических препаратов.

В данной работе исследовали гипоксическое состояние клеток ОМЛ, культивируемых в многоклеточных структурах.

В качестве объекта исследования использовали клетки ОМЛ человека линии ТНР-1. Для формирования многоклеточных структур клетки высевали по 5×10^3 клеток в лунку в 100 мкл полной ростовой среды в 96-луночные планшеты, покрытые 1,5% раствором агарозы (Panreac, Испания) и культивировали в течение 5 дней (120 ч). В контрольных условиях клетки ТНР-1 высевали по 5×10^3 клеток в лунку в 100 мкл полной ростовой среды в 96-луночные планшеты и культивировали течение 24 ч. Гипоксическое состояние оценивали по уровню экспрессии белка HIF-1 α , который является субъединицей транскрипционного фактора, индуцированного гипоксией 1 (HIF-1), для этого клетки окрашивали моноклональными антителами PE anti-human HIF-1 α и PE Mouse IgG1, k isotype Ctrl (Biolegend, США). А также по окрашиванию клеток зондом Nurxoxia Green Reagent (Thermo Fisher, США), который используется для определения низких уровней кислорода в клетках. Определения проводили на проточном цитометре Accuri C6 (BD Bioscience, США). Анализировали не менее 30000 событий (клеток). В качестве положительного контроля использовали клетки ТНР-1, которые культивировали в условиях 5% CO₂ и 1,5% O₂ содержания в воздухе при 37 С в течение 24 ч. Опыты проводили не менее, чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с использованием дисперсионного анализа (ANOVA).

Показано, что у клеток ТНР-1 в многоклеточных структурах, устойчивых к действию химиотерапевтических препаратов, уровень экспрессии белка HIF-1 α достоверно ($p \geq 0,05$) не отличался от контрольных клеток. В свою очередь, при культивировании клеток ТНР-1 в условиях 5% CO₂ и 1,5% O₂ содержания в воздухе при 37 С в течение 24 ч, уровень экспрессии белка HIF-1 α увеличивался более чем в 3 раза.

Далее было показано, что средняя интенсивность флуоресценции Nurxoxia Green Reagent в клетках ТНР-1 в многоклеточных структурах достоверно ($p \geq 0,05$) не отличалась от контрольных клеток. В свою очередь, при культивировании клеток ТНР-1 в условиях 5% CO₂ и 1,5% O₂ содержания в воздухе при 37 С в течение 24 ч, средняя интенсивность флуоресценции Nurxoxia Green Reagent увеличивалась более чем в 10 раз.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что в многоклеточных структурах повышение устойчивости клеток ОМЛ к действию химиотерапевтических препаратов не связано с приобретением клетками гипоксического фенотипа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90062.