

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-131-139>



Разработка доклинической модели миелоидных опухолей с высокой экспрессией иммунных контрольных точек

Д.А. Сеничкина¹, А.И. Шакирова¹, О.С. Епифановская¹, И.Н. Гапоненко¹, Т.А. Пятизбыанцев¹,
Е.В. Белоцерковская², А.Б. Мальшечева², К.В. Лепик¹, И.С. Моисеев¹

¹НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8;

²ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук»; Россия, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-кт, 4

Контакты: Дина Александровна Сеничкина dina-caruk@mail.ru

Введение. Миелодиспластический синдром – группа злокачественных заболеваний крови опухолевой природы с высоким риском трансформации в острый миелоидный лейкоз. Один из подходов к лечению – воздействие на иммунные контрольные точки (ИКТ), гиперэкспрессирующиеся на опухолевых клетках. Для разработки таких препаратов необходимы релевантные модели для высокопроизводительного скрининга и изучения данных биологически активных веществ, так как традиционно используемые модели (мышинные и биоматериал пациентов) труднодоступны, финансово- и трудозатратны и характеризуются плохо воспроизводимым результатом.

Цель исследования – разработать модель на основе миелоидной клеточной линии человека с повышенной экспрессией PD-L1 и TIM-3 для исследования активности ингибиторов сигнальных путей ИКТ, присутствие которых в опухолевом микроокружении больных миелодиспластическим синдромом и острым миелоидным лейкозом ассоциировано с высоким риском и ухудшением прогноза.

Материалы и методы. Первоначальное тестирование базального уровня экспрессии PD-L1 и TIM-3 проводили на клеточных линиях THP-1, HL-60, OCI-AML2, OCI-AML5, KG-1, Mono-Mac-1. Экспрессию ИКТ индуцировали с использованием интерферона γ . Экспрессию маркеров анализировали через 24 ч после индукции экспрессии ИКТ и добавления ингибитора пути АКТ методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Базальная экспрессия исследуемых рецепторов ИКТ отсутствовала на клетках всех исследованных линий, кроме KG-1; TIM-3 был представлен на $88,4 \pm 7,1$ % клеток, а экспрессия PD-L1 была характерна для $88 \pm 8,5$ % событий. Добавление интерферона γ в концентрации 50 нг/мл в культуру Mono-Mac-1 приводило к значимому увеличению доли TIM-3- и PD-L1-экспрессирующих клеток до $53,3 \pm 12,2$ и $97,3 \pm 1,1$ % соответственно по сравнению с $0,1 \pm 0,1$ и $0,1 \pm 0,1$ % без добавления интерферона γ , а для THP-1 наблюдалась экспрессия только PD-L1 ($87,5 \pm 20$ %; контроль – $0,1 \pm 0,1$ %) при концентрации интерферона γ в среде 50 нг/мл, при этом доля TIM-3-экспрессирующих клеток составляла $6,9 \pm 10$ % (контроль – $0,1 \pm 0,1$ %).

Заключение. В качестве модели с повышенной экспрессией PD-L1 и TIM-3 на основе миелоидной клеточной линии человека выбраны линии: KG-1, которая постоянно экспрессирует значимые уровни целевых ИКТ, а также THP-1 и Mono-Mac-1, в которых проводится индукция интерфероном γ в концентрации 50 нг/мл. Работоспособность модели подтверждена рациональным ответом на ингибитор пути АКТ.

Ключевые слова: TIM-3, PD-L1, THP-1, KG-1, Mono-Mac-1

Для цитирования: Сеничкина Д.А., Шакирова А.И., Епифановская О.С. и др. Разработка доклинической модели миелоидных опухолей с высокой экспрессией иммунных контрольных точек. Онкогематология 2024;19(4):131–9. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-131-139>

Development of a preclinical model of myeloid tumors with high immune checkpoints expression

D.A. Senichkina¹, A.I. Shakirova¹, O.S. Epifanovskaya¹, I.N. Gaponenko¹, T.A. Pyatiizbyantsev¹, E.V. Belotserkovskaya²,
A.B. Malyshecheva², K.V. Lepik¹, I.S. Moiseev¹

¹Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 L'va Tolstogo St., Saint Petersburg 197022, Russia;

²Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences; 4 Tikhoretsky Prospekt, Saint Petersburg 194064, Russia

Contacts: Dina Aleksandrovna Senichkina dina-caruk@mail.ru

Background. Myelodysplastic syndrome is a group of malignant blood diseases with a high risk of transformation into acute myeloid leukemia. One treatment approach is to target immune checkpoints (ICPs) that are overexpressed on tumor cells. To develop these drugs, relevant models are needed for high-throughput screening and study of these biologically active substances, since traditionally used models (mouse and patient biomaterials) are difficult to access, financially and labor-intensive, and are characterized by poorly reproducible results.

Aim. To develop a model based on a human myeloid cell line with increased expression of PD-L1 and TIM-3 to study the activity of ICPs inhibitors, the presence of which in the tumor microenvironment in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia was associated with a high risk and worse prognosis.

Materials and methods. Initial testing of the PD-L1 and TIM-3 basal expression level was carried out on cell lines: THP-1, HL-60, OCI-AML2, OCI-AML5, KG-1, Mono-Mac-1. Induction of ICP expression was carried out using interferon γ . Analysis of marker expression was carried out 24 hours after induction of ICPs expression and addition of MK-2206 using flow cytometry.

Results. Basal expression of the studied ICPs receptors was absent in all of them, except for KG-1; TIM-3 was present in 88.4 ± 7.1 % of cells, and PD-L1 – in 88 ± 8.5 %. The addition of interferon γ at a concentration of 50 ng/mL to the Mono-Mac-1 culture led to a significant increase in the proportion of TIM-3 and PD-L1 expressing cells (53.3 ± 12.2 and 97.3 ± 1.1 % respectively, compared to 0.1 ± 0.1 and 0.1 ± 0.1 % without interferon γ), and for THP-1 only PD-L1 expression (87.5 ± 20 %, control 0.1 ± 0.1 %) was observed at the concentration of interferon γ in a medium of 50 ng/mL, while the proportion of cells expressing TIM-3 was 6.9 ± 10 % (control 0.1 ± 0.1 %).

Conclusion. The KG-1 line, which constantly expresses significant levels of target ICPs, as well as THP-1 and Mono-Mac-1, which are induced by 50 ng/mL interferon γ , were selected as a model with increased PD-L1 and TIM-3 expression based on a human myeloid cell line. The model efficiency was confirmed by the rational response to the ICP pathway inhibitor.

Keywords: TIM-3, PD-L1, THP-1, KG-1, MonoMac-1

For citation: Senichkina D.A., Shakirova A.I., Epifanovskaya O.S. et al. Development of a preclinical model of myeloid tumors with high immune checkpoints expression. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2024;19(4):131–9. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-131-139>

Введение

Миелодиспластический синдром (МДС) – группа злокачественных заболеваний системы крови опухолевой природы с высоким риском трансформации в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и общей выживаемостью больных ≤ 2 лет в подгруппах высокого риска [1]. Помимо внутренних механизмов злокачественных клеток, внешние факторы иммунного микроокружения костного мозга выступают в качестве потенциальных детерминант инициации и развития заболевания. Например, повышенная экспрессия ингибирующих рецепторов иммунных контрольных точек (ИКТ), в частности PD-1 (programmed cell death 1) и его лиганда PD-L1, а также TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3), может приводить к истощению Т-клеток и ускользанию злокачественного клона от иммунного надзора при МДС высокого риска [2].

По данным литературы, гиперэкспрессия PD-L1 наблюдается на 36 % CD34⁺-клеток, полученных из костного мозга больных МДС, и 2,5 % – больных ОМЛ [3]. При этом бластные клетки PD-L1⁺, выделенные от пациентов с МДС, демонстрируют преимущество в росте по сравнению с бластными клетками PD-L1⁻. Кроме того, результаты исследований показали, что бластные клетки PD-L1⁺ у пациентов с МДС/ОМЛ имели более высокую устойчивость к элиминации, опосредованную эффекторными Т-клетками, которая частично устранялась блокадой PD-L1 [4].

В последние годы широко разрабатываются терапевтические подходы, связанные с применением

антител и низкомолекулярных ингибиторов против данных контрольных точек. Моноклональные антитела к PD-1/PD-L1 продемонстрировали клиническую эффективность и были зарегистрированы для лечения ряда злокачественных новообразований [5]. В ряде исследований оценивалась эффективность PD-1/PD-L1-ингибиторов в качестве монотерапии для лечения МДС/ОМЛ: несмотря на обнадеживающие доклинические результаты, данные клинических исследований сообщили лишь об умеренном улучшении [6]. Поэтому интересны дальнейшее выявление надежных биомаркеров, изучение оптимальных комбинированных методов лечения и определение подгрупп пациентов, которым может быть полезен блокатор PD-1/PD-L1 [7].

Ввиду высокой представленности гиперэкспрессии другого рецептора ИКТ – TIM-3 при различных онкологических заболеваниях, в том числе онкогематологических, исследованы также уровни экспрессии данного маркера при острых лейкозах и МДС [8–11]. Прогностическое значение гиперэкспрессии TIM-3 в составе микроокружения МДС и ОМЛ пока не установлено окончательно. В работе N. Tsvetkov и соавт. наблюдались высокие уровни экспрессии TIM-3 и его лиганда Gal-9 на поверхности клеток костного мозга у 32,5 % больных МДС [11]. Кроме того, у 25 % больных выявлена коэкспрессия TIM-3 с PD-1, а лиганды PD-1, CTLA4 и TIM-3 экспрессировались совместно у большинства пациентов. Сопоставление этих данных с имеющимся в литературе описанием TIM-3/Gal-9

аутокринной петли, важной для поддержания клона МДС и трансформации в острый лейкоз, позволяет предположить значение этого сигнального пути у больных МДС высокого риска [3].

Антитела к ТИМ-3 также исследовались в качестве терапевтической опции при остром лейкозе: в моделях ксенотрансплантата, воссозданных с помощью лейкозных или стволовых клеток человека, они элиминируют лейкозные стволовые клетки ОМЛ *in vivo*, но не влияют на нормальный гемопоэз [10]. Низкомолекулярный ингибитор ТИМ-3 ML-T7 в настоящий момент проходит тестирование в рамках доклинических исследований, показывая специфическую активность, сравнимую с действием анти-ТИМ-3 антитела. Кроме того, комбинированная терапия ML-T7 и анти-PD-1 имеет потенциально большую терапевтическую эффективность, чем монотерапия, в моделях *in vivo*. Ранние данные показали, что эта комбинация в целом безопасна и хорошо переносится [12].

Таким образом, ингибирование ИКТ остается областью интенсивных клинических исследований при ОМЛ и МДС как в качестве монотерапии, так и в комбинации с другими соединениями [13]. Для тестирования новых препаратов требуется недорогая и отработанная модель для скрининга препаратов группы ингибиторов сигнальных путей ИКТ (как антител, так и низкомолекулярных ингибиторов самих рецепторов и внутриклеточных мишеней их сигнальных путей). Ввиду высокой клинической и генетической гетерогенности у больных МДС использование материала, полученного от пациентов, затруднено. Кроме того, этот материал труднодоступен и не подходит для массового скрининга, а также дает низковоспроизводимые результаты. Разрабатываемые животные модели, в том числе PDX, ввиду высокой стоимости не подходят для задач скрининга. Таким образом, актуальной является разработка воспроизводимой и доступной модели.

Миелоидные клеточные линии лейкоэмического генеза представляются перспективной моделью, однако в настоящий момент ограничены данные систематических исследований, касающихся профилирования экспрессии ИКТ на их поверхности. Опухолевые линии, экспрессирующие PD-L1, более изучены, чем ТИМ-3-положительные [14]. Также малоизучены культуры миелоидного ряда, конституционально или индуцированно гиперэкспрессирующие ИКТ. Разработаны различные подходы к индукции экспрессии PD-L1. Наиболее часто PD-L1 индуцируют добавлением интерферона γ (IFN- γ) в различных концентрациях [15–17]. Описан метод получения сверхэкспрессии PD-L1 введением плазмиды, содержащей данную последовательность [18]. Также проводились исследования о влиянии гипометилирующих агентов на активацию экспрессии ИКТ [3]. Экспрессия ТИМ-3 на опухолевых клеточных линиях изучена намного меньше. Показана возможность индукции ТИМ-3 на Т-клетках добавле-

нием различных интерлейкинов [19]. Увеличение экспрессии ТИМ-3 в клеточных линиях HL-60 и ТНР-1 при 24-часовой стимуляции форбол-миристат-ацетатом показано в исследовании ТИМ-3/Gal-9 [20]. Также возможна активация моноцитов с помощью липополисахаридов для достижения различных эффектов, включая индукцию экспрессии ИКТ [21].

Цель исследования — создать модель с повышенной экспрессией PD-L1 и ТИМ-3 на основе клеточной линии человека лейкоэмического генеза для исследования ингибиторов сигнальных путей ИКТ при миелоидных неоплазиях. Задачи исследования включали оценку базальной экспрессии ИКТ на опухолевых клеточных линиях человека лейкоэмического генеза, а также создание модели со стимулированной экспрессией ИКТ.

Материалы и методы

Клеточные линии и культивирование

Первоначальное тестирование базального уровня экспрессии PD-L1 и ТИМ-3 проводили на клеточных линиях миелоидного происхождения: ТНР-1, HL-60, OCI-AML2, OCI-AML5, KG-1, Моно-Mac-1. Линии предоставлены Российской коллекцией клеточных культур ИИЦ РАН. Клетки культивировали в среде RPMI (Capricorn, Германия) с добавлением 10 % FBS (neoFroxx, Китай) в условиях 37 °C, 5 % CO₂.

Индукция экспрессии иммунных контрольных точек в клеточных линиях

Модели на основе клеточных линий с высокой экспрессией PD-L1 создавали с использованием IFN- γ (Ингарон, Россия), который добавляли в культуральную среду в концентрации 2,5–750 нг/мл за 24 ч до оценки эффекта [16]. Зависимость доли PD-L1-экспрессирующих клеток от концентрации IFN- γ в среде определяли на клеточной линии ТНР-1.

Тестирование низкомолекулярных ингибиторов АКТ-киназы на эффективность подавления экспрессии иммунных контрольных точек

В полученных моделях клеточных линий тестировали активность низкомолекулярного АКТ-ингибитора МК-2206 дигидрохлорида (Sigma-Aldrich, США) в отношении влияния на экспрессию ИКТ. Клетки культивировали в присутствии ингибитора в конечной концентрации 5–30 мкМ в течение 24 ч до оценки экспрессии в присутствии активатора.

Проточная цитофлуориметрия

Экспрессию ИКТ анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Окрашивание клеток проводили смесью моноклональных антител, специфических к ТИМ-3 (CD366-APC) и PD-L1 (CD274-PE-Cy7) человека (Biolegend, США). В ходе экспериментов проводили расширенный анализ профиля экспрессии ИКТ клеточными линиями с использованием антител к человеческим антигенам (табл. 1).

Таблица 1. Антитела, использованные в анализе методом цитофлуориметрии

Table 1. Antibodies used in the cytofluorimetry analysis

Антиген Antigen	Флюорохром Fluorochrome	Компания, каталожный номер Company, catalog number
CD 366	APC	BioLegend, 364804
CD 274	PE/Cyanine7	Elabscience, E-AB-F1133H
CD 155	Pacific Blue	BioLegend, 337632
CD 47	FITC	BioLegend, 323106
CD16	FITC	Elabscience, E-AB-F1236C
CD 279	PE	Elabscience, E-AB-F1229D
CD 68	APC	BioLegend, 333810
CD 223	PE/Cyanine7	BioLegend, 304030
CD 45	Brilliant Violet 510	BioLegend, 304036
CD 80	Brilliant Violet 510	BioLegend, 305243
TIGIT	APC/Cyanine7	BioLegend, 372743
CD 112	PE	BioLegend, 337410
CD 11b	PerCP-Cy5.5	Elabscience, E-CK-FR1146J
CD 163	Brilliant Violet 510	BioLegend, 333612
7-aad	PerCP	Elabscience, E-CK-A162
DRAQ7	APC/Cyanine 7	BioLegend, 424001

Перед окрашиванием клетки осаждали центрифугированием с использованием режима 300 g в течение 5 мин, ресуспендировали в 1-кратном растворе фосфатно-солевого буфера и инкубировали с антителами в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. После окрашивания образцы дважды отмывали фосфатно-солевым буфером с центрифугированием при тех же параметрах, окрашивали витальным красителем 7-AAD (Biolegend, США) в течение 15 мин и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II. Данные анализировали с использованием программного обеспечения BD FACSDiva Software. В качестве контроля использовали неокрашенные клетки.

Статистическая обработка результатов

Статистическая значимость между группами рассчитана по критерию Краскела–Уоллиса, графики построены с использованием программы Microsoft Office Excel.

Результаты

Тестирование базального уровня экспрессии иммунных контрольных точек

Результаты предварительного скрининга базального уровня экспрессии исследуемых ИКТ показали

отсутствие таковых на всех клеточных линиях, кроме KG-1. Доля ИКТ-экспрессирующих клеток линии KG-1 составила $88,4 \pm 7,14$ % для TIM-3 и $88 \pm 8,49$ % для PD-L1.

По результатам скрининга клетки THP-1 выбраны для отработки модели индукции экспрессии TIM-3 и PD-L1.

Индукция экспрессии иммунных контрольных точек в клеточных линиях

Результаты отработки протокола индукции экспрессии PD-L1 с использованием клеток THP-1 представлены на рис. 1. Добавление IFN- γ в среду продемонстрировало дозозависимое увеличение доли PD-L1-позитивных клеток без потери жизнеспособности. Оптимальный уровень экспрессии >50 % ($87,48 \pm 20$ %) наблюдали при концентрации IFN- γ в среде 50 нг/мл, которую в дальнейшем использовали в качестве рабочей концентрации.

Эффективность использования рабочей концентрации IFN- γ 50 нг/мл в плане индукции PD-L1 и TIM-3 протестирована на клеточных линиях THP-1, Mono-Mac-1, HL-60, OCI-AML2, OCI-AML5. В этих условиях отмечалось значимое увеличение доли ИКТ-позитивных клеток в линиях THP-1 и Mono-Mac-1. Для Mono-Mac-1 доля PD-L1- и TIM-3-экспрессирующих клеток составила $97,30 \pm 1,13$ и $53,26 \pm 12,20$ % соответственно после стимуляции по сравнению с $0,11 \pm 0,11$ и $0,14 \pm 0,12$ % при контроле ($p < 0,01$) (рис. 2). В отношении THP-1 отмечались высокая экспрессия PD-L1 ($87,42 \pm 20,04$ %) и плохо воспроизводимое повышение уровня экспрессии TIM-3. В клетках AML-2 отмечалось повышение уровня PD-L1 ≤ 30 % (данные не показаны). В клетках HL-60, AML-5 эффекта экспрессии PD-L1 и TIM-3 добиться не удалось. Влияние на жизнеспособность не было статистически значимым.

Таким образом, среди тестируемых клеточных линий в качестве моделей с высокой базальной экспрессией ИКТ выбрана клеточная линия KG-1, а в качестве модельных линий с индуцированной экспрессией ИКТ в дальнейших экспериментах использованы

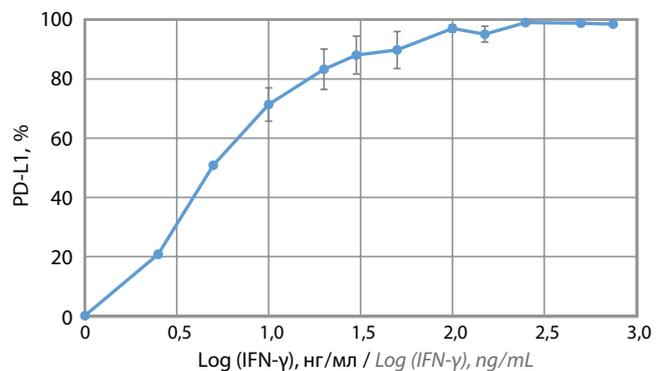


Рис. 1. Результаты индукции экспрессии PD-L1 на клетках линии THP-1 в условиях культивирования в присутствии титруемого интерферона γ (IFN- γ)

Fig. 1. Results of PD-L1 expression induction on THP-1 cells under cultivation conditions in the presence of titrated interferon γ (IFN- γ)

Моно-Мас-1 и ТНР-1 после стимуляции в среде с добавлением IFN-γ в рабочей концентрации. В отношении выбранных моделей проведен расширенный анализ профиля экспрессии ИКТ (табл. 2). Для контрольных клеточных культур проанализирована расширенная панель кластеров дифференциации.

В контрольном образце ТНР-1 после культивирования в среде 50 нг/мл IFN-γ были повышены (>20 %) маркеры: CD 155 (99,87 %), CD 223 (23,75 %), CD 47 (99,85 %), TIGIT (69,98 %), CD 112 (99,38 %). В KG-1: CD 155 (96,35 %), CD 223 (94,91 %), CD 47 (98,85 %), TIGIT (93,71 %), CD 112 (93,16 %). Моно-Мас-1 после культивирования с IFN-γ: CD 155 (87,55 %), CD 223 (41,79 %), CD 47 (99,96 %), TIGIT (80,65 %), CD 112 (98,26 %). Не показали экспрессии на всех линиях: CD 279, CD 163, CD 68, CD 80, Gal-9.

Тестирование низкомолекулярных ингибиторов АКТ-киназ в плане эффективности подавления экспрессии иммунных контрольных точек

Первоначально способность АКТ-ингибитора МК-2206 опосредовать снижение доли ИКТ-экспрессирующих клеток протестирована на модельной линии KG-1, в которой представленность PD-L1 и TIM-3 на поверхности была высокой в отсутствие дополнительной стимуляции (рис. 3).

Согласно полученным данным, ингибитор МК-2206 статистически значимо снижал долю PD-L1-позитивных

клеток в линии KG-1 в концентрациях 10, 20, 30 мкМ с $84,03 \pm 21,2$ до $76,24 \pm 4,11$; $42,6 \pm 18,1$ и $4,28 \pm 4,22$ % соответственно ($p < 0,017$). Снижение уровня экспрессии

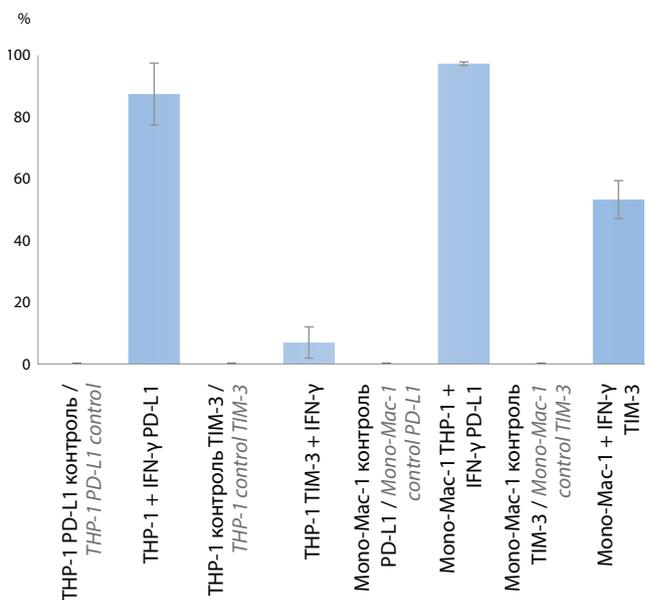


Рис. 2. Результаты оценки экспрессии иммунных контрольных точек на поверхности тестируемых клеток в условиях культивирования в присутствии рабочей концентрации интерферона γ (IFN-γ) 50 нг/мл
Fig. 2. Results of assessing the ICPs expression on the surface of tested cells under cultivation conditions in the presence of a working interferon γ (IFN-γ) concentration 50 ng/mL

Таблица 2. Результаты анализа расширенной панели кластеров дифференциации, %

Table 2. Analysis of an extended panel of differentiation clusters, %

CD	ТНР-1 + IFN-γ	KG-1	Моно-Мас-1 + IFN-γ
CD 155	99,87	96,35	87,55
CD 223	23,75	94,91	41,79
CD 279	0,01	0,26	0,72
CD 45	93,91	99,98	97,22
CD 47	99,85	98,85	99,96
TIGIT	69,88	93,71	80,65
TIM-3	17,58	87,69	46,93
CD 112	99,38	93,16	98,26
CD 11b	71,71	28,53	26,62
CD 163	0,26	0,01	0,03
CD 274	99,16	97,44	97,58
CD 68	1,57	0,87	5,81
CD 80	0,09	0,06	0,12
Gal9	0,04	0	0,27

Примечание. IFN-γ – интерферон γ.
Note. IFN-γ – interferon γ.

ТІМ-3 также зафиксировано при добавлении МК-2206 20 и 30 мкМ с $85,52 \pm 12,63$ до $67,55 \pm 8,62$ и $21,90 \pm 7,61$ % соответственно ($p < 0,013$). Статистически значимого снижения жизнеспособности клеток в сравнении с контролем не выявлено ($p > 0,18$).

Далее эффективность подавления экспрессии ИКТ в условиях культивирования в присутствии МК-2206 оценена в моделях с индуцированной экспрессией PD-L1 с использованием клеточных линий ТНР-1 и Моно-Мас-1, а также с индуцированной экспрессией ТІМ-3 в клетках Моно-Мас-1 (рис. 4).

В модели индуцированной экспрессии ИКТ Моно-Мас-1 мы наблюдали дозозависимый эффект ингибитора МК-2206 в отношении снижения экспрессии как PD-L1 ($p = 0,028$), так и ТІМ-3 ($p < 0,024$). При этом повышение концентрации МК-2206 > 10 мкМ сопровождалось значимым снижением жизнеспособности до $49,77 \pm 0,44$ % ($p = 0,024$) при концентрации МК-2206 20 мкМ и до $15,98 \pm 7,59$ % ($p = 0,0043$) при 30 мкМ.

Также мы наблюдали значимое снижение экспрессии PD-L1 в клетках ТНР-1 при добавлении 30 мкМ МК-2206 до $12,52 \pm 12,09$ % ($p = 0,0004$) (рис. 5), что сопровождалось снижением количества жизнеспособных клеток с $87,26 \pm 18,9$ до $13,63 \pm 5,28$ % ($p = 0,004$), в остальных концентрациях изменения не были значимыми.

Обсуждение

Проведен скрининг культур клеток человека миелоидного ряда ТНР-1, НL-60, ОСІ-AML2, ОСІ-AML5, КG-1, Моно-Мас-1. Без дополнительной стимуляции

экспрессия исследуемых рецепторов ИКТ отсутствовала на поверхности всех из них, кроме КG-1. В данной линии рецептор ТІМ-3 был представлен на $88,4 \pm 7,14$ % клеток, а экспрессия PD-L1 была характерна для $88 \pm 8,49$ % событий. В отношении остальных клеточных линий протестированы экспериментальные условия индукции экспрессии ИКТ. Отработку условий проводили с использованием клеточной линии ТНР-1. Для этого применяли описанный в литературе протокол с использованием IFN- γ [16]. Культивирование с интерфероном в концентрации 2,5–750 нг/мл было ассоциировано с дозозависимым увеличением экспрессии PD-L1. Согласно полученным результатам, индукция экспрессии на уровне $87,48 \pm 20$ % наблюдалась при концентрации IFN- γ в среде 50 нг/мл. При этом доля ТІМ-3-экспрессирующих клеток была ниже и составляла $6,9 \pm 10$ %. Добавление интерферона в отработанной концентрации 50 нг/мл в культуру Моно-Мас-1 приводило к значимому увеличению доли PD-L1- и ТІМ-3-экспрессирующих клеток до $97,30 \pm 1,13$ и $53,26 \pm 12,2$ % соответственно. В клетках AML-2 в условиях стимуляции IFN- γ зафиксировано изолированное увеличение экспрессии PD-L1 < 30 %. В клетках НL-60, AML-5 эффекта экспрессии ИКТ в условиях стимуляции с помощью IFN- γ добиться не удалось (данные не представлены).

Результаты системного анализа данных литературы показали, что профиль экспрессии ИКТ в клеточных линиях человека исследован слабо. Имеются данные об экспрессии маркеров PD-L1 и ТІМ-3 для клеток ТНР-1 [16, 22, 23]. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования Н. Spangenberg

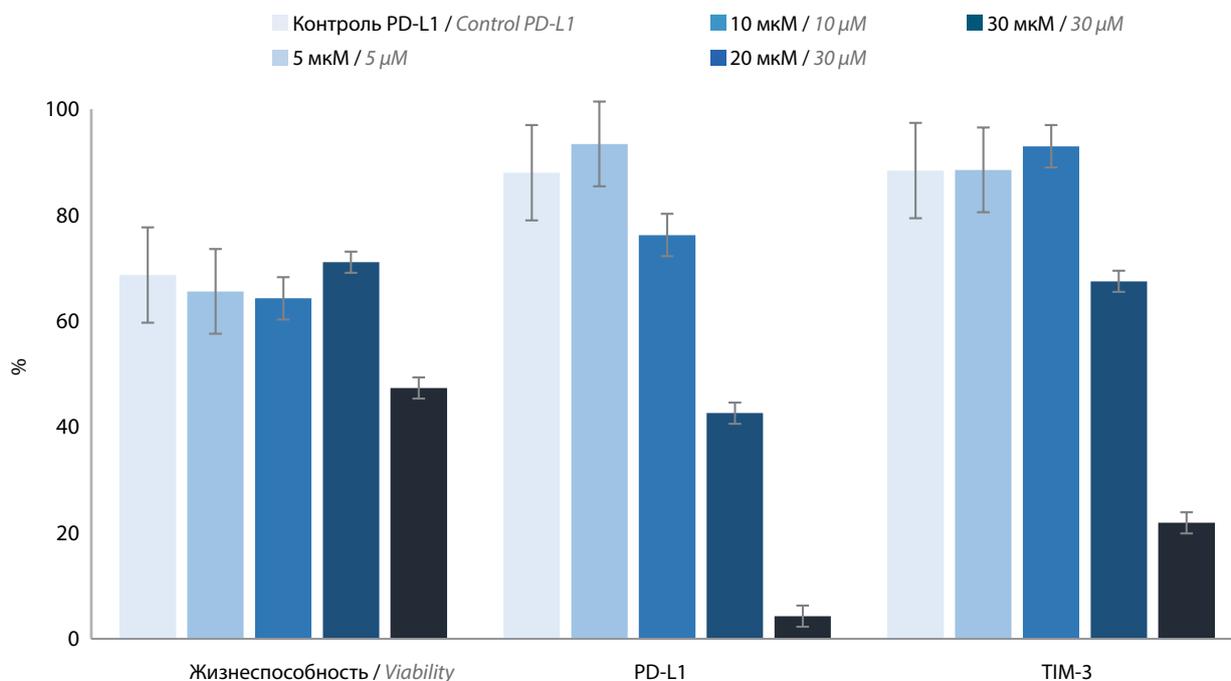


Рис. 3. Влияние МК-2206 на экспрессию PD-L1 и ТІМ-3 в культуре клеток КG-1
Fig. 3. Effect of MK-2206 on PD-L1 and TIM-3 expression in KG-1 cell culture

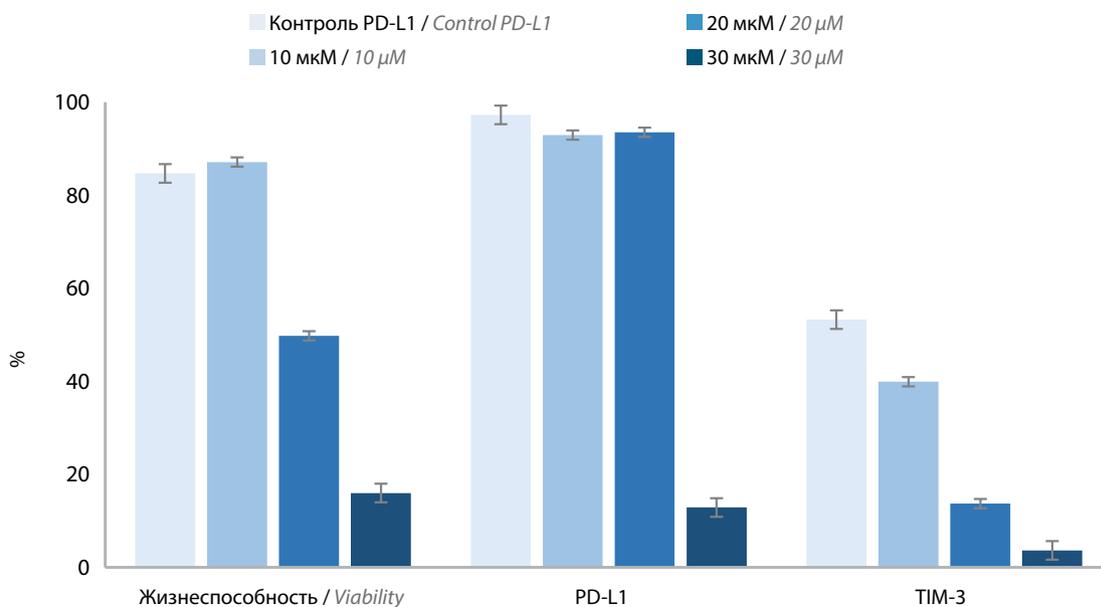


Рис. 4. Влияние МК-2206 на экспрессию PD-L1 и TIM-3 в культуре клеток Mono-Mac-1
Fig. 4. Effect of MK-2206 on PD-L1 and TIM-3 expression in Mono-Mac-1 cell culture

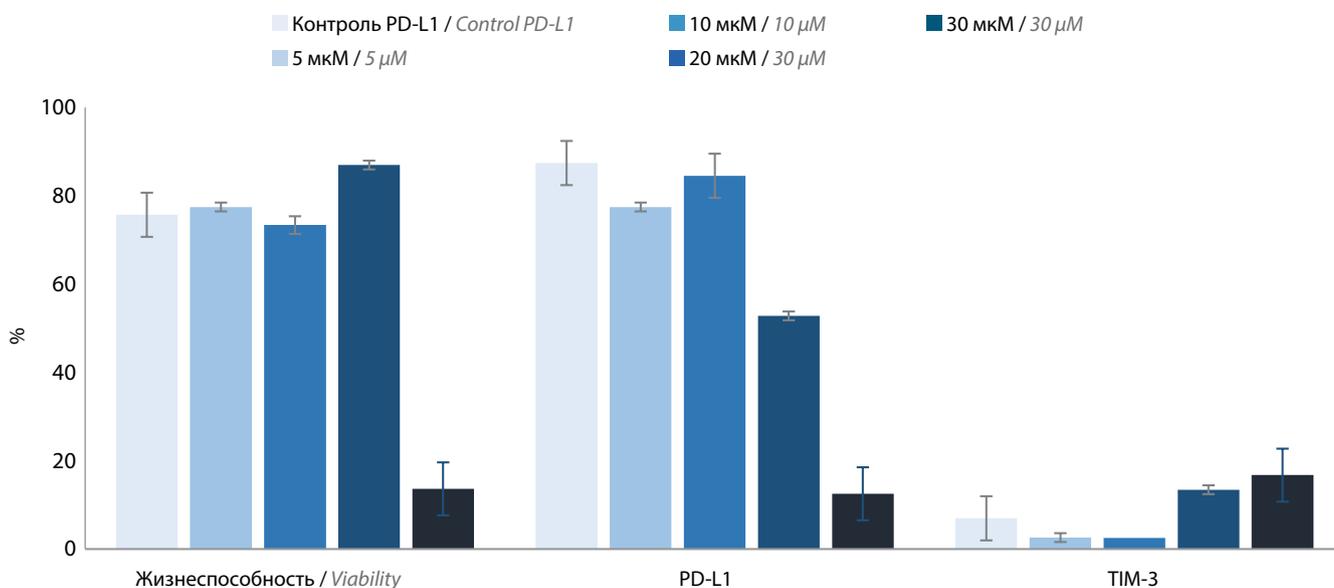


Рис. 5. Влияние МК-2206 на экспрессию PD-L1 и TIM-3 в культуре клеток THP-1 в присутствии интерферона γ
Fig. 5. Effect of MK-2206 on PD-L1 and TIM-3 expression in THP-1 cell culture in the presence of interferon γ

и соавт., которые показали, что в условиях индукции интерфероном экспрессия PD-L1 дозозависимо возрастала [16]. В то же время описанный нами профиль экспрессии ИКТ для клеток культур KG-1 и Mono-Mac-1 представлен в настоящей работе впервые. Дальнейшие исследования проводили на выбранных моделях с базальным уровнем экспрессии ИКТ (KG-1), а также индуцированной экспрессии (Mono-Mac-1, THP-1).

Значимость ингибиторов АКТ в терапии МДС и ОМЛ продемонстрирована в доклинических и клинических исследованиях, хотя механизм эффективно-

сти установлен не окончательно. Одним из наиболее исследованных ингибиторов АКТ является МК-2206, высокоспецифичный аллостерический ингибитор всех 3 изоформ АКТ человека, который был охарактеризован в рамках доклинических и клинических исследований [24]. Ни в одном из предыдущих клинических и доклинических исследований АКТ при ОМЛ ингибирование контрольных точек не оценивалось как конечная точка, хотя связь экспрессии PD-L1 и пути описана в литературе [18]. В связи с этим мы посчитали целесообразным оценить эффективность МК-2206-препарата в отношении ингибирования

экспрессии ИКТ, тестируемых в данной работе. Согласно полученным результатам, снижение экспрессии PD-1 и TIM-3 было характерно как в клеточной модели с базальной экспрессией ИКТ, так и в моделях с индуцированной экспрессией. Стоит отметить, что при низких концентрациях ингибитора АКТ мы не наблюдали значимого снижения жизнеспособности тестируемых клеток.

Полученные данные доказывают (пока косвенно) правомочность гипотезы о связи внутриклеточных сигнальных путей АКТ и ИКТ. Дальнейшее уточнение механизмов этой взаимосвязи, несомненно, будет

способствовать выявлению новых мишеней для таргетной терапии МДС и ОМЛ.

Заключение

В качестве модели с повышенной экспрессией PD-L1 и TIM-3 на основе миелоидной клеточной линии человека выбраны линии KG-1, которая константно экспрессирует значимые уровни целевых ИКТ, а также TNP-1 и Моно-Мас-1, в которых проводится индукция интерфероном в концентрации 50 нг/мл. Работоспособность модели подтверждена рациональным ответом на ингибитор пути АКТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Chen H., Wang M., Weng T. et al. The prognostic and clinicopathological significance of Tim-3 and PD-1 expression in the prognosis of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Urol Oncol* 2021;39(11):743–53. DOI: 10.1016/j.urolonc.2021.05.039
- Kouroukli O., Symeonidis A., Foukas P. et al. Bone marrow immune microenvironment in myelodysplastic syndromes. *Cancers (Basel)* 2022;14(22):5656. DOI: 10.3390/cancers14225656
- Yang H., Bueso-Ramos C., DiNardo C. et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia* 2014;28(6):1280–8. DOI: 10.1038/leu.2013.355
- Kondo A., Yamashita T., Tamura H. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2010;116(7):1124–31. DOI: 10.1182/blood-2009-12-255125
- Ai L., Chen J., Yan H. et al. Research status and outlook of PD-1/PD-L1 inhibitors for cancer therapy. *Drug Des Devel Ther* 2020;14:3625–49. DOI: 10.2147/DDDT.S267433
- Yi M., Zheng X., Niu M. et al. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Mol Cancer* 2022;21(1):28. DOI: 10.1186/s12943-021-01489-2
- Yang X., Ma L., Zhang X. et al. Targeting PD-1/PD-L1 pathway in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol* 2022;11(1):11. DOI: 10.1186/s40164-022-00263-4
- Jan M., Chao M.P., Cha A.C. et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(12):5009–14. DOI: 10.1073/pnas.1100551108
- Zhang L., Du H., Xiao T.W. et al. Prognostic value of PD-1 and TIM-3 on CD3⁺ T cells from diffuse large B-cell lymphoma. *Biomed Pharmacother* 2015;75:83–7. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.08.037
- Kikushige Y., Shima T., Takayanagi S. et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7(6):708–17. DOI: 10.1016/j.stem.2010.11.014
- Tsvetkov N., Gusak A., Morozova E. et al. Immune checkpoints bone marrow expression as the predictor of clinical outcome in myelodysplastic syndrome [published correction appears in *Leuk Res Rep* 2022;17:100301]. *Leuk Res Rep* 2020;14:100215. DOI: 10.1016/j.lrr.2020.100215
- Ma S., Tian Y., Peng J. et al. Identification of a small-molecule TIM-3 inhibitor to potentiate T cell-mediated antitumor immunotherapy in preclinical mouse models. *Sci Transl Med* 2023;15(722):eadg6752. DOI: 10.1126/scitranslmed.adg6752
- Abaza Y., Zeidan A.M. Immune checkpoint inhibition in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cells* 2022;11(4):2249. DOI: 10.3390/cells11142249
- Grenga I., Donahue R.N., Lepone L. et al. PD-L1 and MHC-I expression in 19 human tumor cell lines and modulation by interferon-gamma treatment. *J Immunother Cancer* 2014;2(Suppl 3):P102. DOI: 10.1186/2051-1426-2-S3-P102
- Imai Y., Chiba T., Kondo T. et al. Interferon-γ induced PD-L1 expression and soluble PD-L1 production in gastric cancer. *Oncol Lett* 2020;20(3):2161–8. DOI: 10.3892/ol.2020.11757
- Spangenberg S.H., Zavareh R.B., Lairson L.L. Protocol for high-throughput compound screening using flow cytometry in THP-1 cells. *STAR Protoc* 2021;2(2):100400. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100400
- Thiem A., Hesbacher S., Kneitz H. et al. IFN-gamma-induced PD-L1 expression in melanoma depends on p53 expression. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38(1):397. DOI: 10.1186/s13046-019-1403-9
- Wang F., Yang L., Xiao M. et al. PD-L1 regulates cell proliferation and apoptosis in acute myeloid leukemia by activating PI3K-AKT signaling pathway. *Sci Rep* 2022;12(1):11444. DOI: 10.1038/s41598-022-15020-0
- Mujib S., Jones R.B., Lo C. et al. Antigen-independent induction of Tim-3 expression on human T cells by the common γ-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 is associated with proliferation and is dependent on the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol* 2012;188(8):3745–56. DOI: 10.4049/jimmunol.1102609
- Rezaei M., Ghanadian M., Ghezlbash B. et al. TIM-3/Gal-9 interaction affects glucose and lipid metabolism in acute myeloid leukemia cell lines. *Front Immunol* 2023;14:1267578. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1267578
- Sri-Ngern-Ngam K., Keawvilai P., Pisitkun T., Palaga T. Upregulation of programmed cell death 1 by interferon gamma and its biological functions in human monocytes. *Biochem Biophys Rep* 2022;32:101369. DOI: 10.1016/j.bbrep.2022.101369
- Shapourian H., Ghanadian M., Eskandari N. et al. TIM-3/Galectin-9 interaction and glutamine metabolism in AML cell lines, HL-60 and THP-1. *BMC Cancer* 2024;24(1):125. DOI: 10.1186/s12885-024-11898-3
- Gonçalves Silva I., Rüegg L., Gibbs B.F. et al. The immune receptor Tim-3 acts as a trafficker in a Tim-3/galectin-9 autocrine loop in human myeloid leukemia cells. *Oncoimmunology* 2016;5(7):e1195535. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1195535
- Xing Y., Lin N.U., Maurer M.A. et al. Phase II trial of AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced breast cancer who have tumors with PIK3CA or AKT mutations, and/or PTEN loss/PTEN mutation. *Breast Cancer Res* 2019;21(1):78. DOI: 10.1186/s13058-019-1154-8

Вклад авторов

Д.А. Сеничкина: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ данных, написание текста статьи;
А.И. Шакирова, А.Б. Малышечева, К.В. Лепик, И.С. Моисеев: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи;
О.С. Епифановская, И.Н. Гапоненко, Т.А. Пятиизбянцев, Е.В. Белоцерковская: разработка дизайна исследования, синтез и предоставление материалов для исследования, анализ данных, редактирование текста статьи.

Authors' contributions

D.A. Senichkina: design development, data collection for analysis, data analysis, article writing;
A.I. Shakirova, A.B. Malyshecheva, K.V. Lepik, I.S. Moiseev: review of publications on the article topic, design development, data analysis, article writing;
O.S. Epifanovskaya, I.N. Gaponenko, T.A. Pyatiizyantsev, E.V. Belotserkovskaya: design development, synthesis and provision of research materials, data analysis, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.А. Сеничкина / D.A. Senichkina: <https://orcid.org/0000-0003-2220-0591>
А.И. Шакирова / A.I. Shakirova: <https://orcid.org/0000-0003-3767-6840>
О.С. Епифановская / O.S. Epifanovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-8168-6811>
И.Н. Гапоненко / I.N. Gaponenko: <https://orcid.org/0000-0003-1871-3124>
Т.А. Пятиизбянцев / T.A. Pyatiizyantsev: <https://orcid.org/0000-0003-1837-189X>
Е.В. Белоцерковская / E.V. Belotserkovskaya: <https://orcid.org/0000-0003-3985-9552>
А.Б. Малышечева / A.B. Malyshecheva: <https://orcid.org/0000-0002-0820-2913>
К.В. Лепик / K.V. Lepik: <https://orcid.org/0000-0002-4056-050X>
И.С. Моисеев / I.S. Moiseev: <https://orcid.org/0000-0002-4332-0114>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia.