

ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛИ НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

А. А. Актанова^{1,2}✉, М. В. Быкова¹, И. П. Скачков^{1,2}, В. В. Денисова³, Е. А. Пашкина^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения, Новосибирск, Россия

³ Клиника иммунопатологии Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

На сегодняшний день существует теория о том, что пролиферативный потенциал гемопоэтических стволовых клеток истощается, а баланс коммитированных предшественников смещается в сторону супрессоров в ходе развития онкологии, однако дифференцировка гемопоэтических стволовых клеток может варьироваться в зависимости от типа, локализации и специфики микроокружения опухоли. Целью исследования было оценить влияние опухолей различного генеза на CD34⁺-гемопоэтические стволовые клетки ($n = 10$). С помощью метода проточной цитометрии проводили анализ клеточного цикла и дифференцировки клеток как через прямой контакт с опухолью, так и через обмен только гуморальными факторами в трансвеллах. В ко-культуре с K562 количество ГСК, находящихся в синтетической фазе, составило 2,1%, в контроле — 11,2% ($p = 0,01$); в ко-культуре с SK-mel37 количество клеток, находящихся в фазе G₂-M клеточного цикла, снижалось до 0,3% ($p < 0,05$). 1301 и K562 направляли дифференцировку ГСК в сторону гранулоцитарно-макрофагальных предшественников ($p < 0,05$), а 1301 и SK-mel37 в сторону общих мультипотентных предшественников. Интересно, что после инкубации с K562 в трансвеллах статистически значимо увеличивалось количество плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток в два раза по сравнению с контролем (24,17% и 10,19% соответственно). Таким образом, свойства гемопоэтических клеток могут меняться как от вида опухоли, так и от способа взаимодействия с ними.

Ключевые слова: гемопоэтическая стволовая клетка, дифференцировка клеток, коммитированные предшественники, пролиферация, проточная цитометрия, Т-клеточный лейкоз, хроническая миелогенная лейкемия, меланома

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 23–25-10099.

Вклад авторов: А. А. Актанова — дизайн исследования, выполнение экспериментальной части, анализ и интерпретация данных, подготовка, редактирование рукописи; М. В. Быкова — анализ литературы, интерпретация данных, редактирование текста; И. П. Скачков — пробоподготовка, работа с иллюстрациями, В. В. Денисова — предоставление материала исследования, консультирование, Е. А. Пашкина — планирование, разработка и редактирование дизайна исследования, анализ данных, редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 145 от 19 апреля 2024 г.). Все условно здоровые доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алина Александровна Актанова
ул. Ядринцевская, д. 14, г. Новосибирск, 630099, Россия; aktanova_al@mail.ru

Статья получена: 02.12.2024 **Статья принята к печати:** 16.12.2024 **Опубликована онлайн:** 27.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.065

IMPACT OF TUMOR ON THE CELL CYCLE AND DIFFERENTIATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Aktanova AA^{1,2}✉, Bykova MV¹, Skachkov IP^{1,2}, Denisova VV³, Pashkina EA^{1,2}

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

³ Immunopathology Clinic, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

Today, there is a theory that proliferative potential of hematopoietic stem cells is depleted, and the balance of committed precursor cells shifts towards suppressors during the development of cancer. However, differentiation of hematopoietic stem cells can vary depending on the tumor type, localization, and microenvironment specifics. The study aimed to assess the impact of tumors of various origins on the CD34⁺ hematopoietic stem cells ($n = 10$). Assessment of the cell cycle and cell differentiation via both direct contact with the tumor and exchanging humoral factors only in transwells was conducted by flow cytometry. In the co-culture with K562, the number of hematopoietic stem cells being in their synthesis phase was 2.1%, while in the control it was 11.2% ($p = 0.01$); in the co-culture with SK-mel37, the number of hematopoietic stem cells being in the G₂-M cell cycle phase was reduced to 0.3% ($p < 0.05$). 1301 and K562 directed the hematopoietic stem cell differentiation towards granulocyte-macrophage precursor cells ($p < 0.05$), while 1301 and SK-mel37 directed it towards common multipotent progenitor cells. It is interesting that the number of pluripotent hematopoietic stem cells significantly increased (2-fold) compared to control after incubation with K562 in transwells (24.17% and 10.19%, respectively). Thus, properties of hematopoietic stem cells can vary depending on both tumor type and the way of interacting with these cells.

Keywords: hematopoietic stem cell, cell differentiation, committed precursor cells, proliferation, flow cytometry, T-cell leukemia, chronic myelogenous leukemia, melanoma

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 23–25-10099.

Author contribution: Aktanova AA — study design, experimental procedure, data analysis and interpretation, manuscript writing and editing; Bykova MV — literature review, data interpretation, manuscript editing; Skachkov IP — sample preparation, handling illustrations; Denisova VV — providing the biomaterials for the study, advising; Pashkina EA — planning, developing and editing the study design, data analysis, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (protocol No. 145 dated 19 April 2024). All the conditionally healthy donors submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alina A. Aktanova
Yadrincevskaya, 14, Novosibirsk, 630099, Russia; aktanova_al@mail.ru

Received: 02.12.2024 **Accepted:** 16.12.2024 **Published online:** 27.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.065

Известно, что важным компонентом ниши костного мозга являются гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), которые в результате созревания и дифференцировки формируют пул клеток крови на протяжении всей жизни. Ниша — особое микроокружение с гуморальными факторами и специфическими клеточными контактами для ГСК, обеспечивающими строго регулируемые процессы самоподдержания или самообновления и дифференцировки клеток. ГСК обладают уникальным клеточным циклом с асимметричным делением для поддержания и обновления пула плюрипотентных ГСК и, одновременно, для генерирования необходимых общих или более дифференцированных предшественников. Активность ГСК зависит напрямую от клеточного цикла, от его продолжительности или времени до входа в клеточный цикл, а также частоты клеточных делений. Важно, что в гомеостатических условиях большинство ГСК в значительной степени должны находиться в фазе G0 клеточного цикла или в фазе покоя (до 95%), чтобы предотвратить преждевременное истощение клеток, при этом самообновление клеток и дифференцировка наступают в фазу G2 [1]. Поскольку обычно ГСК находятся в условиях ниши в состоянии покоя, опосредованном внутри- и внеклеточными механизмами, включая некоторые ингибиторы пролиферации, например CXCL4 и TGF β , секретируемые мегакариоцитами [2], изменения в межклеточном контакте или концентрации, а также появлении новых гуморальных факторов способны вывести ГСК из состояния покоя, индуцировать их пролиферацию и дифференцировку, аналогичную пролиферации ГСК во время кровопотери, облучения или действия провоспалительных цитокинов [3]. В свою очередь, это приведет к снижению их функциональности, аберрантной регуляции клеточного цикла и даже злокачественности [4, 5]. Интересно, что деление клеток при этом не является обязательным этапом перед дифференцировкой в общие миелоидные, мегакариоцитарно-эритроидные и пре-мегакариоцитарные предшественники [6]. Наряду с данными предшественниками в гемопоэтическом процессе выделяют общие мультипотентные и лимфоидные предшественники. Каждую клетку можно отличить по маркерам дифференцировки, которые ГСК приобретает в процессе специализации и действия различных стимулов, в частности комбинации колониестимулирующих факторов. Классическим вариантом стимулов являются также цитокины, однако они могут оказывать негативное и позитивное влияние на дифференцировку. Так, индуцировать миелопоэз способны GM-CSF, G-CSF, M-CSF, EPO, TPO, SCF/KL, FL, TNF, LIF, IL12, IL11, IL6, IL5, IL4, IL3, IL1, SDF-1, FGF-4, а угнетать TNF, IL4, TGF β , IFN, MIP-1, IL10, IL13, и для активации лимфопоэза необходимы IL2, IL4, IL7, а угнетения — TGF β , IL4 [7]. В микроокружении опухоли, благодаря наличию большого количества опухоль-ассоциированных клеток, синтезируется широкий спектр факторов, который потенциально способен направлять дифференцировку ГСК в те или иные общие или более специализированные предшественники. Таким образом, при определенных условиях возможно расширение пула самих ГСК, предшественников ГСК и соответственно изменение их функциональной активности, которое может привести к развитию патологического процесса в организме или ухудшению течения имеющегося. Так, например, при опухолевом процессе формируется специфическое микроокружение, в котором по последним данным гемопоэтические стволовые клетки

играют немаловажную роль. Известно, что опухоль способна рекрутировать клетки в процессе онкогенеза, ГСК не являются исключением, при этом все клетки, произошедшие из ГСК в микроокружении солидных опухолей, участвуют в процессах опухолевой инвазии, ее росте, прогрессировании и химиорезистентности к препаратам [8]. Нередко ГСК или так называемые опухоль-ассоциированные ГСК являются опухоль иницирующими клетками и в процессе могут вызывать дифференцировку других клеток в фибробласты, макрофаги и эндотелиальные клетки, которые поддерживают рост и рецидив опухоли посредством продукции и секреции факторов роста и компонентов внеклеточного матрикса в дополнение к запуску процесса ангиогенеза [9]. Таким образом, наряду с другими опухоль-ассоциированными клетками, гемопоэтическая стволовая клетка принимает активное участие в поддержании и прогрессировании опухолевого процесса, однако на сегодняшний день аспекты взаимодействия гемопоэтических стволовых клеток и опухолевых остаются малоизученными. Поэтому необходимо исследовать влияние не только межклеточного контакта, но и гуморальных факторов опухоли на ключевые этапы жизнедеятельности ГСК, такие как пролиферативная способность, клеточный цикл и дифференцировка, что и явилось целью нашего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

CD34⁺-сепарированные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) доноров ($n = 10$, средний возраст — $38,1 \pm 3,4$ года) были получены в Клинике иммунопатологии НИИФКИ. В исследовании в качестве материала использовали также клеточную линию человеческого Т-клеточного лейкоза 1301, клеточную линию человеческого хронического миелоидного лейкоза K562 (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур, Sigma Aldrich, Merck KGaA, Германия) и клеточную линию человеческой меланомы Sk-mel-37, любезно предоставленную Лабораторией клеточных технологий НИИФКИ (Новосибирск, Россия).

Культивирование ГСК

Процедуру размораживания и промывания криоконсервированных CD34-положительных образцов ГСК проводили в соответствии со стандартными рекомендациями для замороженных первичных клеток [10, 11]. HSC подсчитывали в 0,01%-м (10 мг/мл) растворе метиленового синего («Биолот», Россия) для определения жизнеспособности клеток с использованием камеры Горяева. Полученные клетки культивировали в различных количествах (от 100 000 до 1 000 000 кл./мл) с соответствующей средой RPMI-1640 («Панэко», Россия) или средой для размножения гемопоэтических стволовых клеток Stemline II (STEM) (Sigma Aldrich Co. LLC, США) в качестве положительного контроля, дополненных 50 мг/мл гентамицина (Dalfarma, Россия), 25 мг/мл тиенама (Merck Sharp & Dohme Corp., Кенилворт, Нью-Джерси, США) в течение различного времени в зависимости от серии экспериментов при 37 °C, 5% CO₂ и увлажненной атмосфере.

Культивирование линий опухолевых клеток

Суспензионные линии опухолевых клеток K562 и 1301 и адгезионную линию SK-mel37 культивировали в стандартных

условиях с использованием полной культуральной среды RPMI-1640 + 2 мМ глутамин + 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США). Культуры поддерживали в диапазоне от 100 000 до 1 000 000 кл./мл, при 5% CO₂ и 37 °C. Кондиционные среды отбирали с расчетом на серию экспериментальные среды экспоненциальную фазу роста опухолевых линий и замораживали для дальнейшего использования.

Жизнеспособность и пролиферация ГСК

ГСК в количестве 1×10^5 кл./250 мл инкубировали с кондиционными средами опухолевых линий от 1301, K562, SK-mel 37 в различных разведениях 100%, 50%, 10% с дополнением до установленного объема полной культуральной средой RPMI-60 с 10%-м человеческим альбумином (Октафарма Фармацевтика Продуктсионгес м.б.Х., Австрия) в плоскодонном 96-луночном планшете (TPP, Швейцария) в триплетах в течение 3, 5 и 7 дней. В качестве положительного контроля использовали специализированную клеточную среду STEM. В качестве отрицательного контроля — DMSO. Условия культивирования ГСК были стандартными: при 37 °C, 5% CO₂, 90% относительной влажности.

Также ГСК в количестве 1×10^5 кл./250 мл инкубировали с опухолевыми линиями в специальных планшетах для полного исключения клеточного контакта — в 12-луночных трансвеллах с размером пор 0,4 мкм, диаметром вставки 6,5 мм (Corning Incorporated, Costar, Аризона, США) в течение трех дней в тех же условиях.

Жизнеспособность и пролиферативную активность ГСК оценивали при помощи реагента WST-1 (Takara Bio Inc., Кусацу, Япония). Анализ образцов проводили колориметрически с помощью микропланшетного ридера Tecan Infinite F50 (Австрия) с длиной волны 450 нм (эталон 650 нм).

Клеточный цикл ГСК

Предварительно ГСК окрашивали CFSE-красителем (Invitrogen, Юджин, Орегон, США) согласно протоколу производителя для отличия их от опухолевых клеток в культуре в планшете.

ГСК в соотношении 1 : 1 — 1×10^5 кл./мл и 10 : 1 — 1×10^6 кл./мл к опухолевым клеткам инкубировали в 24-луночном планшете как ко-культуру для оценки влияния прямого контакта опухолевых клеток на стволовые и в 12-луночных трансвеллах для оценки влияния только гуморальных факторов в течение трех суток в тех же условиях, в качестве контроля использовали интактные клетки в средах RPMI и STEM. Затем клетки переносили в цитометрические пробирки и фиксировали в ледяном 70% спирте на льду в течение 2 ч, трижды отмывали, потом добавляли красящий раствор на основе EtBr (Serva Electrophoresis GmbH, Гейдельберг, Германия) 1 мг/мл, RNAазу А («Микроген», Россия) 5 мкг/мл, 10% фетальной бычьей сыворотки и PBS + ЭДТА, окрашивали в течение 30 мин при температуре 37 °C. Готовые образцы анализировали с помощью 14-цветного проточного цитофлуориметра LongCyte (Challenbio, Китай) с программным обеспечением ModelFlower.

Дифференцировка ГСК

ГСК в соотношении 10 : 1 — 1×10^6 кл./мл к опухолевым клеткам (поскольку для оценки коммитированных

предшественников необходимо большее количество клеток) инкубировали в 24-луночном планшете как ко-культуру и в 12-луночных трансвеллах в тех же условиях. Затем клетки переносили в цитометрические пробирки и окрашивали с помощью моноклональных антител к CD10 PE (BioLegend, США), CD34 APC (BioLegend, США), CD38 PE-Cy7 (ElabScience, Китай), CD45RA PerCP (ElabScience, Китай), CD90 APC-Cy7 (Cloud-Clone Corp., США), Lin- (коктейль CD3/14/16/19/20/56) FITC (BioLegend, США). Опытные образцы анализировали с помощью 14-цветного проточного цитофлуориметра LongCyte (Challenbio, Китай) с программным обеспечением ModelFlower. При оценке флуоресценции для каждого моноклонального антитела был выполнен Fluorescent minus one контроль (FMO). Клетки предшественники типировали по поверхностным маркерам следующим образом: плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки (пГСК) Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺; общие мультипотентные предшественники (оМПП) Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻; общие предшественники лимфоцитов (ОЛП) Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD90⁻; миелоидные и мегакариоцитарно-эритроидные предшественники (Э-МП) Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD45RA⁻CD10⁻; гранулоцитарно-моноцитарно-предшественники (Г-МП) Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD10⁻; предшественники В- и NK-клеток (В-NK-П) Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD10⁺. Также относительное количество предшественников оценивали до посадки в культуру в качестве контроля дифференцировки («до»).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.0. Тест Фридмана использовали для оценки различий между группами, где значение $p < 0,05$ считали статистически значимым. Данные были представлены как медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль) ± межквартильный размах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первым шагом мы оценили жизнеспособность и пролиферативную активность стволовых гемопоэтических клеток в трех временных точках с разной долей гуморальных факторов от опухолевых линий различного генеза. Так, мы продемонстрировали, что в кондиционных средах с различной концентрацией от опухолевых линий поддерживалась жизнеспособность ГСК на уровне контроля на 3-и сутки. На 5-е сутки сохранялась не только жизнеспособность, но и началась пролиферация во всех разведениях кондиционных сред, на 7-е сутки поддерживался примерно тот же уровень пролиферации (рис. 1). При этом на 3-и и 5-е сутки жизнеспособность ГСК была выше в 50%-й и 100%-й кондиционной среде от SK-mel37 (рис. 1А, Б), однако на 7-е сутки резко снизилась их жизнеспособность (рис. 1В). Возможно, это связано с тем, что ГСК активнее пролиферировали в кондиционной среде от SK-mel37, и к 7-м суткам, предположительно, из-за отсутствия питательных веществ клетки начали погибать.

В пользу важности гуморального влияния на свойства ГСК говорят и результаты, полученные при культивировании ГСК с опухолевыми линиями в условиях, исключающих клеточный контакт, так на уровне достоверных различий, было установлено, что пролиферативная активность ГСК была выше в трансвеллах, чем в контроле при одинаковом количестве клеток (рис. 2Б). Обращает на себя внимание и то, что SK-mel 37 обладает более высокой пролиферативной способностью в трансвеллах с ГСК по

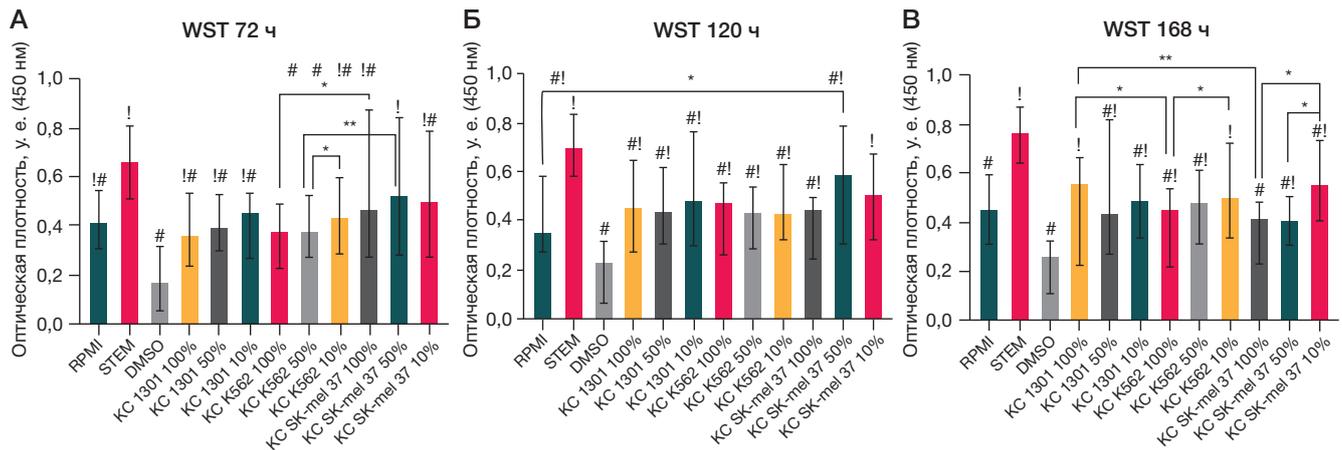


Рис. 1. Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности гемопоэтических стволовых клеток при сокультивации с кондиционными средами от опухолевых линий 1301, K562 и SK-mel в 10%, 50% и 100% разведении в течение 72 (А), 120 (Б) и 168 (В) часов (WST). Критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; # — достоверные различия по сравнению с контролем STEM; ! — достоверные различия по сравнению с контролем DMSO. * — достоверные различия, $p < 0,05$; ** — достоверные различия, $p < 0,005$

сравнению с линией 1301 в эквивалентных количествах (рис. 2А).

Далее мы оценили влияние сокультивирования на фазы клеточного цикла ГСК, так количество клеток, находящихся в фазе G2-M, было выше в сокультуре с SK-mel37 по сравнению с другими опухолевыми линиями. Большее количество клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, наблюдалось при клеточном контакте с 1301. Мы также продемонстрировали резкое снижение количества ГСК, культивируемое в трансвеллах с SK-mel37, это связано с гибелью клеток, поскольку 89,4% клеток находятся в фазе Sub-G1 (таблица), интересно, что и в кондиционных средах от SK-mel жизнеспособность и пролиферативная активность ГСК также снижалась, однако к 7 суткам.

На заключительном этапе при оценке дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток мы обнаружили, что соотношение предшественников было различным, так через трое суток увеличилось количество ГСК и общих мультипотентных предшественников (рис. 3А), при этом в большей степени увеличилось количество последних (рис. 3В), а вот количество общих лимфоидных,

мегакариоцитарных, эритроидных и миелоидных предшественников, наоборот, снизилось (рис. 3Б). Интересно, что при этом количество ГСК и МПП было достоверно ниже на 20,3% в трансвеллах с K562 по сравнению с другими опухолями в трансвеллах (рис. 3А), а значение плюрипотентных гемопоэтических клеток с фенотипом Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻ было выше по сравнению не только с другими опухолями в тех же условиях, но и контрольными образцами (рис. 4). Примечательно, что большее относительное количество гранулоцитарно-моноцитарных предшественников наблюдалось в ко-культуре с 1301 и K562, по сравнению с культурами в трансвеллах с теми же опухолями и контрольной средой (рис. 4). Количество общих предшественников тромбоцитов, эритроцитов и клеток миелоидного ряда снижалось при культивировании с клетками меланомы SK-mel-37 в условиях как прямого клеточного контакта, так и при обмене гуморальными факторами, при этом достоверной разницы между трансвеллами и ко-культурой в планшете получено не было (рис. 4).

Таким образом, под действием гуморальных факторов опухоли K562 относительное количество плюрипотентных

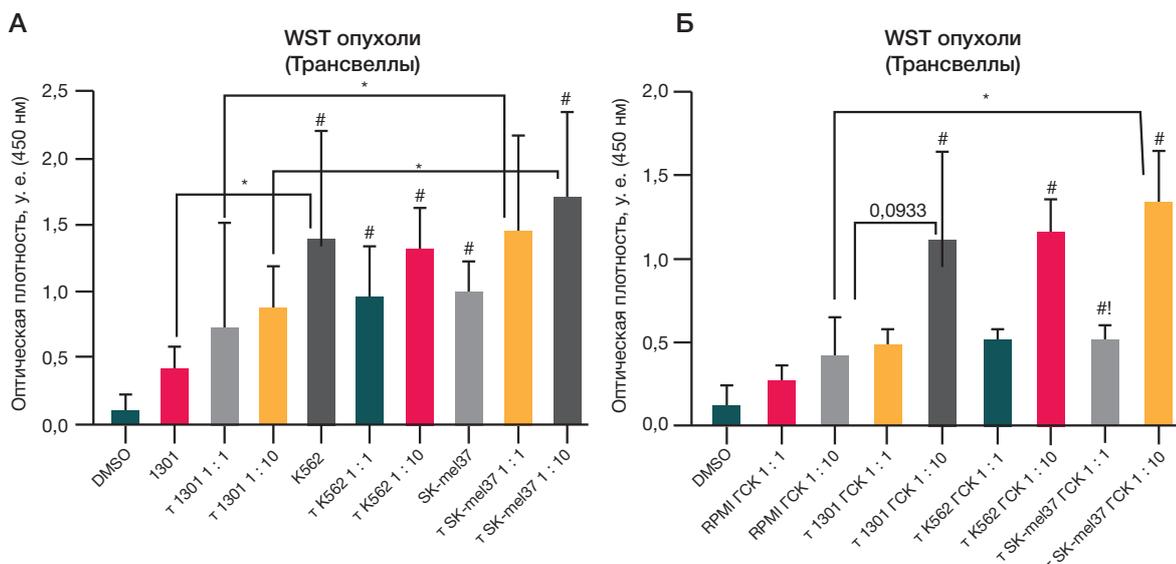


Рис. 2. Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности опухолевых клеток линий 1301, K562 и SK-mel37 (А) и гемопоэтических стволовых (Б) и при сокультивации в трансвеллах (т) в течение 72 ч. Критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; # — достоверные различия по сравнению с контролем DMSO; ! — тенденция по сравнению с SK-mel 37 ГСК 1:10, $p = 0,05$; * — достоверные различия, $p < 0,05$

Таблица. Относительное количество гемопоэтических стволовых клеток в разных фазах клеточного цикла при сокультивации с опухолевыми линиями 1301, K562 и SK-mel37 в ко-культуре (к-к) и в трансвеллах (т) в течение 72 ч

	G2/M	S	G0-G1	Sub-G1
RPMI 1/1	3,1 (0,2-6,7)	8,6 (3,6-25,7)	77,4 (63,9-86,9)	3,5 (0,9-4,7)
RPMI 1/10	0,5 (0,4-1,9)	11,2 (5,1-13,9)	82,6 (74,1-87,0)	1,3 (1,1-4,3)
к-к 1301 1/1	15,7 (8,3-21,9)	3,9 (1,1-11,2)	76,8 (65,6-81,0)	5,1 (0,2-7,5)
к-к 1301 1/10	11,5 (3,0-20,9)	13,0 (5,9-31,3)#	79,6 (63,6-95,4)	2,2 (0,5-3,5)
т 1301 1/1	3,0 (2,5-9,2)!	3,8 (2,2-24,1)	77,5 (69,1-88,9)	4,4 (0,8-6,8)
т 1301 1/10	3,2 (1,3-5,8)!	7,2 (1,9-11,3)	86,9 (84,5-93,3)	1,3 (0,5-2,3)!!
к-к K562 1/1	10,1 (0,4-27,2)	5,8 (1,8-32,1)	72,9 (59,1-83,5)	7,9 (3,7-12,6)
к-к K562 1/10	4,4 (1,3-7,3)	2,1 (1,4-3,8)**	83,9 (78,7-91,9)**	4,6 (1,9-6,6)
т K562 1/1	1,2 (0,4-4,4)	6,6 (3,5-22,6)	81,9 (72,9-88,7)	3,2 (0,9-5,6)
т K562 1/10	1,9 (1,2-16,6)	6,5 (3,6-7,6)	84,5 (72,7-89,6)	2,9 (1,1-3,6)
к-к SK-mel37 1/1	0,3 (0,1-0,6)*	7,2 (4,3-19,4)	71,9 (66,6-93,6)	6,8 (1,7-14,9)
к-к SK-mel37 1/10	1,0 (0,2-2,8)	12,5 (4,9-16,8)	86,1 (53,4-87,9)	3,8 (0,5-5,8)
т SK-mel37 1/1	1,6 (0,6-14,8)	6,4 (3,1-28,5)	78,9 (76,6-89,1)	1,2 (0,6-4,4)
т SK-mel37 1/10	0,5 (0,3-6,0)	4,7 (2,0-12,0)	1,6 (0-6,61)\$	89,4 (84,9-91,8)***

Примечание: критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$; * — достоверные различия по сравнению с к-к K562 1/1, к-к 1301 1/1; ** — достоверные различия по сравнению с к-к 1301 1/10, к-к SK-mel37 1/10, RPMI 1/10; *** — достоверные различия по сравнению с т SK-mel37 1/1, к-к SK-mel37 1/10, т K562 1/10, т 1301 1/10, RPMI 1/10; ! — достоверные различия по сравнению с контролем RPMI в эквивалентных концентрациях; !! — достоверные различия по сравнению с т 1301 1/1; # — тенденция, $p = 0,05$ по сравнению с к-к 1301 1/1, т 1301 1/10; \$ — достоверные различия по сравнению с т SK-mel37 1/1, к-к SK-mel37 1/10, т K562 1/10, т 1301 1/10, RPMI 1/10

ГСК увеличивалось, при клеточном контакте ГСК с K562 и с 1301 увеличивалось количество предшественников гранулоцитарно-моноцитарного ряда.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микроокружение опухоли — сложная, динамичная структура, являющаяся регулятором онкогенеза. Проблема изучения микроокружения опухоли в экспериментальных моделях остается актуальной на сегодняшний день. Можно выделить две основные составляющие микроокружения опухоли — синтез и обмен гуморальными факторами, а также образование перекрестных связей между клетками в условиях «клеточного соседства». Под влиянием опухоли клетки способны изменять свои свойства и функции. Известно о специфических клетках с собственным функционалом в микроокружении опухоли, это так называемые опухоль-ассоциированные макрофаги, фибробласты, дендритные клетки и другие [12–14], участвующие в процессе онкогенеза. Эти клетки на сегодняшний день могут быть рассмотрены и как

информативный маркер, и как терапевтическая мишень. Поскольку мы говорили о том, что в микроокружении опухоли обнаруживаются гемопоэтические стволовые клетки, немаловажным было оценить влияние опухоли на свойства ГСК.

По нашим данным, дифференцировка ГСК в культуре наступала на 3-и сутки, когда к 3-м суткам клетки активировались и начинали пролиферировать, а к 7-м суткам начинали дифференцироваться. Примечательно то, что ГСК способны вступать в раннюю дифференцировку на 3-и сутки под влиянием различных факторов [15]. В целом, количество клеток и дифференцировка ГСК зависят от того, взаимодействует она с опухолевой клеткой напрямую или опосредованно через гуморальные факторы. Общий паттерн в дифференцировке ГСК наблюдался у 1301 и K562, скорее всего, потому что оба типа опухоли являются по происхождению клонами гемопоэтических клеток, также следует отметить, что сдвиг в сторону гранулоцитарно-моноцитарного ряда связан с высоким риском метастазирования [16], что в целом характерно для лейкозов. Между тем ГСК

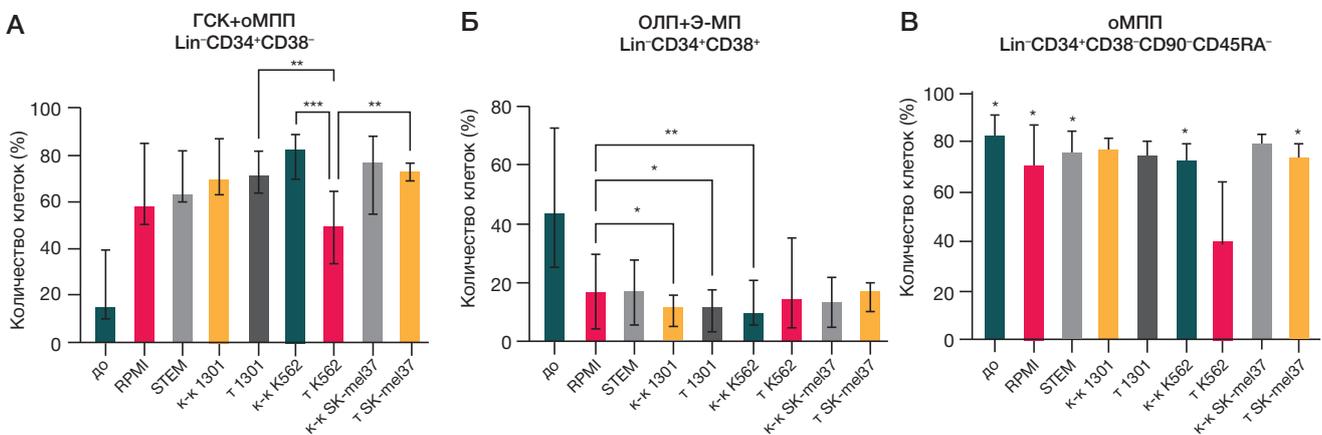


Рис. 3. Относительное количество общих предшественников гемопоэтических стволовых клеток при сокультивации с опухолевыми линиями 1301, K562 и SK-mel37 в ко-культуре (к-к) и в трансвеллах (т) в течение 72 ч. Критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха. * — достоверные различия по сравнению с т K562, $p < 0,05$

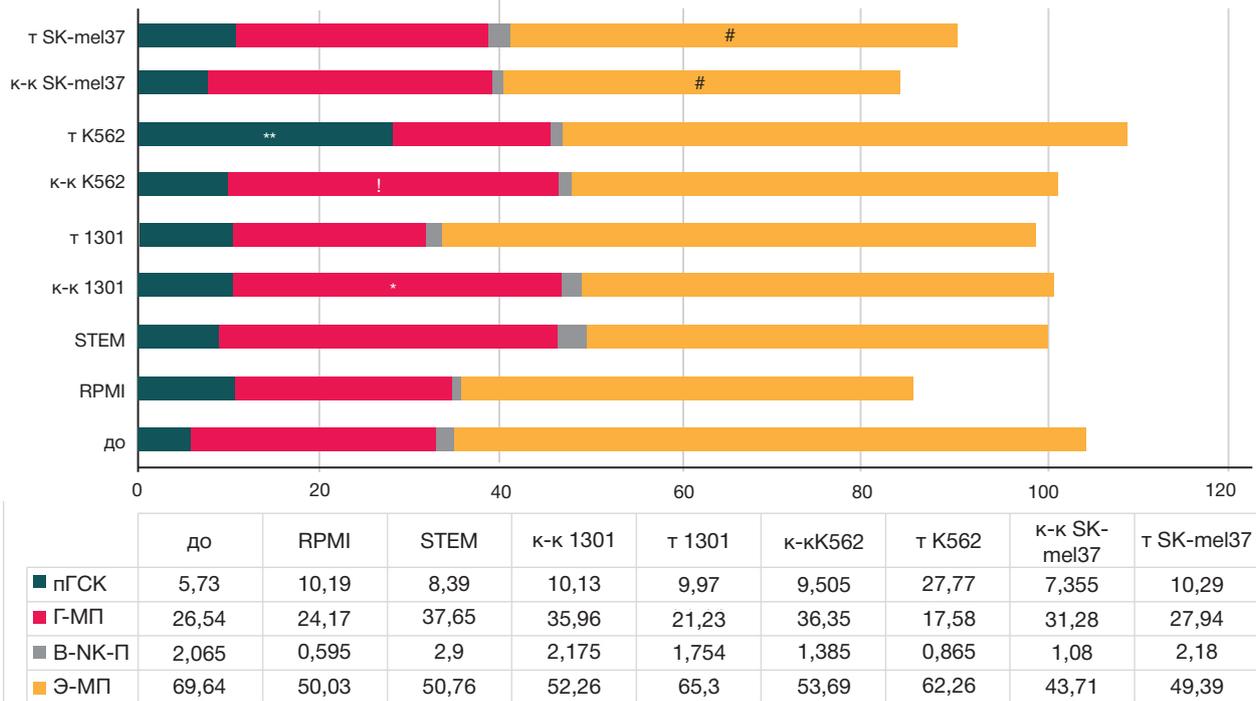


Рис. 4. Относительное количество предшественников гемопоэтических стволовых клеток при сокультивации с опухолевыми линиями 1301, K562 и SK-mel37 в ко-культуре (к-к) и в трансвеллах (т) в течение 72 ч. Критерий Фрийдмана, достоверные различия $p < 0,05$, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; * — достоверные различия по сравнению с контролем RPMI, т K562; ** — достоверные различия по сравнению со всеми опытными группами, $p < 0,005$; ! — тенденция по сравнению с т K562, $p = 0,06$; # — тенденция по сравнению с контролем до и RPMI, $p = 0,05$

при культивации с солидной опухолью меланомой имели несколько отличающееся соотношение клеток со снижением общих предшественников миелопоэза и увеличением мультипотентных предшественников ($p = 0,05$). Интересно, что, согласно литературным источникам, дифференцировка ГСК направляется не только в сторону клеток миелоидного ряда при солидных опухолях, в частности миелоидных супрессоров [17], но и в сторону менее дифференцированных клеток с сохранением мультипотентности [18], что согласуется с нашими данными.

ВЫВОДЫ

В зависимости от типа опухоли меняются пролиферативная активность, деление клеток и дифференцировка.

Опухолевые линии лейкозов K562 и 1301 аналогично влияют на жизнеспособность и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток, тогда как солидная опухоль — меланома SK-mel-37 оказывает другой эффект на те же процессы, что говорит нам как о частных, так и об общих закономерностях влияния опухолей на жизнедеятельность гемопоэтической стволовой клетки. Для более полного понимания влияния опухоли на свойства ГСК необходимо использовать более комплексный подход, включающий изучение секрета клеток, маркеров рекрутинга и ассоциированности с опухолевым процессом, а также использовать более сложные и релевантные методы сокультивирования клеток, учитывающие сложную, динамичную и гетерогенную структуру опухолевого микроокружения.

Литература

- Treichel S, Filippi M-D. Linking cell cycle to hematopoietic stem cell fate decisions. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 11:1231735. DOI: 10.3389/fcell.2023.1231735.
- Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Redox Signal.* 2018; 10; 29 (2): 191–204. DOI: 10.1089/ars.2017.7419.
- Baldrige MT, King KY, Goodell M.A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends in Immunology.* 2011; 32 (2), 57–65. DOI: 10.1016/j.it.2010.12.003.
- Chavez JSPU, Loeffler D, Higa KC, Hernandez G, Mills TS. PU.1 enforces quiescence and limits hematopoietic stem cell expansion during inflammatory stress. *Exp Med.* 2011; 218 (6), e20201169. DOI: 10.1084/jem.20201169.
- Pietras EM, Warr MR, Passequé E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *Cell Biol.* 2011; 195 (5): 709–20. DOI: 10.1083/jcb.201102131.
- Grinenko T, Eugster A, Thielecke L, et al. Hematopoietic stem cells can differentiate into restricted myeloid progenitors before cell division in mice. *Nat Commun.* 2018; 9, 1898. DOI: 10.1038/s41467-018-04188-7.
- Han W, Yu Y, Liu XY. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. *Cell Res.* 2006; 16: 189–95. DOI: 10.1038/sj.cr.7310026.
- Lu IN, Dobersalske C, Rauschenbach L, et al. Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun.* 2021; 12, 3895. DOI: 10.1038/s41467-021-23995-z.
- Hassan G, Seno M. Blood and Cancer: Cancer Stem Cells as Origin of Hematopoietic Cells in Solid Tumor Microenvironments. *Cells.* 2020; 9 (5): 1293. DOI: 10.3390/cells9051293.
- Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol.* 2007; 82 (6): 463–72. DOI: 10.1002/ajh.20707.
- Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 283–7. DOI: 10.1038/sj.bmt.1700644.

12. Bejarano L, Jordão MJC, Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Discovery*. 2021; 4 (11): 933–59. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1808.
13. Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Research*. 2019; 18 (79): 4557–67. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
14. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, et al. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2019; 5 (234): 5700–21. DOI: 10.1002/jcp.27425.
15. Edel MJ, Menchon C, Vaquero JM, et al. A protocol to assess cell cycle and apoptosis in human and mouse pluripotent cells. *Cell Commun Signal*. 2011; 9 (8): DOI: 10.1186/1478-811X-9-8.
16. Magidey-Klein K, Kveler K, Cooper TJ, Normand R, Zhang T, Timaner M, Raviv Z, et al. Tumor-educated uncommitted hematopoietic stem cells promote a metastatic switch *BioRxiv*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.266189>.
17. Wang X, Li Y. The disruption of hematopoiesis in tumor progression. *BloodSci*. 2019; 1 (1): 88–91. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000001.
18. Lu IN, Dobersalske C, Rauschenbach L, et al. Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun*. 2021; 12, 3895. DOI: 10.1038/s41467-021-23995-z.

References

1. Treichel S, Filippi M-D. Linking cell cycle to hematopoietic stem cell fate decisions. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 11:1231735. DOI: 10.3389/fcell.2023.1231735.
2. Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Redox Signal*. 2018; 10; 29 (2): 191–204. DOI: 10.1089/ars.2017.7419.
3. Baldrige MT, King KY, Goodell M.A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends in Immunology*. 2011; 32 (2), 57–65. DOI: 10.1016/j.it.2010.12.003.
4. Chavez JSPU, Loeffler D, Higa KC, Hernandez G, Mills TS. PU.1 enforces quiescence and limits hematopoietic stem cell expansion during inflammatory stress. *Exp Med*. 2011; 218 (6), e20201169. DOI: 10.1084/jem.20201169.
5. Pietras EM, Warr MR, Passequé E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *Cell Biol*. 2011; 195 (5): 709–20. DOI: 10.1083/jcb.201102131.
6. Grinenko T, Eugster A, Thielecke L, et al. Hematopoietic stem cells can differentiate into restricted myeloid progenitors before cell division in mice. *Nat Commun*. 2018; 9, 1898. DOI: 10.1038/s41467-018-04188-7.
7. Han W, Yu Y, Liu XY. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. *Cell Res*. 2006; 16: 189–95. DOI: 10.1038/sj.cr.7310026.
8. Lu IN, Dobersalske C, Rauschenbach L, et al. Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun*. 2021; 12, 3895. DOI: 10.1038/s41467-021-23995-z.
9. Hassan G, Seno M. Blood and Cancer: Cancer Stem Cells as Origin of Hematopoietic Cells in Solid Tumor Microenvironments. *Cells*. 2020; 9 (5): 1293. DOI: 10.3390/cells9051293.
10. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*. 2007; 82 (6): 463–72. DOI: 10.1002/ajh.20707.
11. Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 19: 283–7. DOI: 10.1038/sj.bmt.1700644.
12. Bejarano L, Jordão MJC, Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Discovery*. 2021; 4 (11): 933–59. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1808.
13. Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Research*. 2019; 18 (79): 4557–67. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
14. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, et al. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2019; 5 (234): 5700–21. DOI: 10.1002/jcp.27425.
15. Edel MJ, Menchon C, Vaquero JM, et al. A protocol to assess cell cycle and apoptosis in human and mouse pluripotent cells. *Cell Commun Signal*. 2011; 9 (8): DOI: 10.1186/1478-811X-9-8.
16. Magidey-Klein K, Kveler K, Cooper TJ, Normand R, Zhang T, Timaner M, Raviv Z, et al. Tumor-educated uncommitted hematopoietic stem cells promote a metastatic switch *BioRxiv*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.266189>.
17. Wang X, Li Y. The disruption of hematopoiesis in tumor progression. *BloodSci*. 2019; 1 (1): 88–91. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000001.
18. Lu IN, Dobersalske C, Rauschenbach L, et al. Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun*. 2021; 12, 3895. DOI: 10.1038/s41467-021-23995-z.