

УДК 616-006.4

ПОВЫШЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО ЛИМФОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В ТРЕХМЕРНЫХ ВЫСОКОПЛОТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

© 2024 г. Д.Ю. Штатнова*, М.И. Кобякова*, **, #, Я.В. Ломовская*, Е.И. Фетисова*, К.С. Краснов*, Р.С. Фадеев*

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

**Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН,
ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия

#E-mail: ritaaaaa49@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

Проведено исследование формирования лекарственной устойчивости клеток острого лимфоидного лейкоза (клеточные линии Jurkat, MOLT 3, MOLT 4) в высокоплотных клеточных культурах. Показано, что в высокоплотных культурах клеток острого лимфоидного лейкоза повышается устойчивость к действию химиотерапевтических препаратов относительно клеток, культивируемых в условиях низкой плотности. Результаты исследования механизма повышения лекарственной устойчивости клеток острого лимфоидного лейкоза в высокоплотных клеточных культурах показали, что повышение лекарственной устойчивости может опосредоваться изменением их пролиферативной активности. Полученные в работе результаты представляют интерес для разработки стратегии подавления лекарственной устойчивости клеток острого лимфоидного лейкоза, зависящей от плотности клеточной культуры.

Ключевые слова: острый лимфоидный лейкоз, лекарственная устойчивость, высокоплотные культуры, пролиферативная активность.

DOI: 10.31857/S0006302924040129, EDN: NGGKKX

Острый лимфоидный лейкоз (ОЛЛ) — злокачественная опухоль лимфоидного ростка гемопоэтической системы. ОЛЛ является наиболее часто встречающимся онкологическим заболеванием у детей — 75% случаев возникают в возрасте до 6 лет [1–3]. ОЛЛ у младенцев (до 1 года) имеет наихудший клинический исход, показатели излечения составляют всего 20–50% [1–3]. 5-летняя выживаемость для людей в возрасте 20 лет и старше составляет 20–40%, для людей в возрасте до 20 лет составляет 65% [1–3]. На данный момент основным способом лечения ОЛЛ является применение химиотерапевтических препаратов. Однако эффективность их применения ограничивается развитием резистентности к их действию у ОЛЛ-клеток, главным образом находящихся в нишах костного мозга [4], что в последующем определяет рецидив заболевания. Многие исследователи

связывают формирование резистентности у клеток ОЛЛ в нишах костного мозга с условиями микроокружения и, прежде всего, с клетками стромы костного мозга, опуская вопрос о взаимном влиянии лейкозных клеток друг на друга [5]. В то же время известно, что озлакачествление костного мозга сопровождается повышенной клеточностью, где доля лейкозных бластов может составлять более 80% от всего клеточного состава [6]. Показано, что количество лейкозных бластов может напрямую влиять на эффективность химиотерапии, поскольку цитотоксическая активность многих химиотерапевтических препаратов зависит от количества опухолевых клеток [7]. Однако механизмы такой резистентности остаются крайне мало изученными. В связи с этим целью данной работы является исследование возможных механизмов многоклеточной резистентности клеток ОЛЛ к действию химиотерапевтических препаратов в высокоплотных культурах. Изучение механизмов устойчивости клеток ОЛЛ к индукции клеточной гибели в высокоплотных куль-

Сокращения: ОЛЛ — острый лимфоидный лейкоз, ВПК — высокоплотная клеточная культура, ЛУ — лекарственная устойчивость.

турах важно для создания новых эффективных способов терапии заболевания и понимания механизмов межклеточных коммуникаций в патологически измененном костном мозге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования в работе использовали клетки острого лимфоидного лейкоза человека линий Jurkat, MOLT 3 и MOLT 4, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma-Aldrich, США) при 37°C, в условиях 5%-го содержания CO₂ в воздухе.

Клетки высевали в количестве $5 \cdot 10^3$ в 100 мкл питательной среды в лунки U-образного 96 луночного культурального планшета. Через сутки после посева количество клеток в лунке увеличивалось до $1 \cdot 10^4$ ($1 \cdot 10^5$ кл/мл), и мы использовали их как культуры низкой плотности. Через 4 и 5 суток культивирования без смены питательной среды количество клеток в лунке вырастало до $5 \cdot 10^4$ ($5 \cdot 10^5$ кл/мл) и $1 \cdot 10^5$ ($1 \cdot 10^6$ кл/мл) соответственно, формируя трехмерный многоклеточный агрегат — высокоплотную клеточную культуру (далее ВПК).

Анализ жизнеспособности. Жизнеспособность клеток после 24 ч инкубации с химиотерапевтическими агентами (топотекан, цитарабин, этопозид и цисплатин) определяли по отношению количества живых клеток в опытных и контрольных (без добавления химиотерапевтических агентов) условиях. Количество живых клеток после инкубации с химиотерапевтическими агентами оценивали по интенсивности восстановления резазурина (Sigma-Aldrich, США). Для этого к клеткам добавляли резазурин (30 мкг/мл), инкубировали с красителем в течение 4 ч при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 532 нм и длине волны испускания 590 нм с использованием планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 (Tecan, Швейцария).

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. Для изучения распределения по фазам клеточного цикла клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере (300 g, 5 мин), фиксировали 70%-м этанолом (24 ч, –20°C). Окрашивание проводили в течение 15 мин при 37°C в среде следующего состава: фосфатно-солевой буфер, 0.1% тритона X-100, 10 мкг/мл йодида пропидия, 100 мкг/мл РНКазы (Биолот, Россия). Анализ проводили с помощью проточного цитометра BD

Accuri C6 (BD Bioscience, США). Полученные результаты обрабатывали в программе ModFit LT 4.1.

Анализ митотической активности. Для определения митотической активности клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере (300 g, 5 мин), фиксировали 70%-м этанолом (24 ч, –20°C). Затем окрашивали флуоресцентным красителем bisBenzimide H 33342 в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре и проводили подсчет числа митотических клеток с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (Leica, Германия), анализировали не менее 500 клеток.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В высокоплотных клеточных культурах повышается устойчивость клеток острого лимфоидного лейкоза к действию химиотерапевтических препаратов. Нами показано, что у клеток острого лимфоидного лейкоза человека линии Jurkat при культивировании в высокоплотных клеточных культурах происходит повышение устойчивости к клеточной гибели, индуцированной действием химиотерапевтических препаратов. При культивировании клеток Jurkat в течение суток при низкой плотности культуры ($1 \cdot 10^5$ кл/мл) величина IC₅₀ для топотекана составляла 0.005 ± 0.001 мкМ, этопозид — 0.13 ± 0.06 мкМ, а при концентрациях цитарабина 26 мкМ количество живых клеток составляло $60.2 \pm 2.5\%$. На 4-е сутки при культивировании клеток Jurkat при высокой плотности культуры ($5 \cdot 10^5$ кл/мл) величина IC₅₀ для топотекана составляла 6.1 ± 0.1 мкМ, для этопозид — 9.2 ± 1.1 мкМ, а при концентрации цитарабина 26 мкМ число живых клеток составляло более $80 \pm 5\%$. В свою очередь, при культивировании клеток Jurkat в течение 5 суток при высокой плотности культуры $1 \cdot 10^6$ кл/мл с топотеканом и цитарабином число живых клеток составляло более $85 \pm 2\%$, с этопозидом — $60 \pm 5\%$ относительно необработанных клеток (рис. 1).

Сходное повышение устойчивости к действию использованных в работе химиотерапевтических препаратов было показано также и для клеточных линий ОЛЛ человека MOLT 3 и MOLT 4, культивируемых в культурах высокой плотности (рис. 2). Исходя из полученных результатов, наиболее выраженный эффект показали клетки

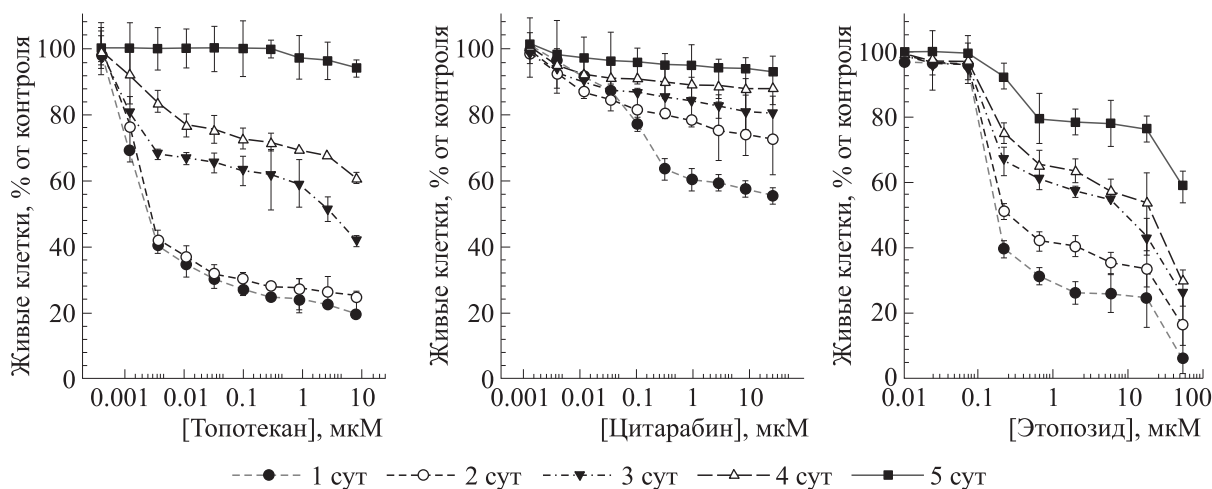


Рис. 1. Жизнеспособность клеток Jurkat после 24 ч инкубации с топотеканом, цитарабином и этопозидом, добавленных к культуре после 1, 2, 3, 4 и 5 суток от момента посева клеток. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($n \geq 3$).

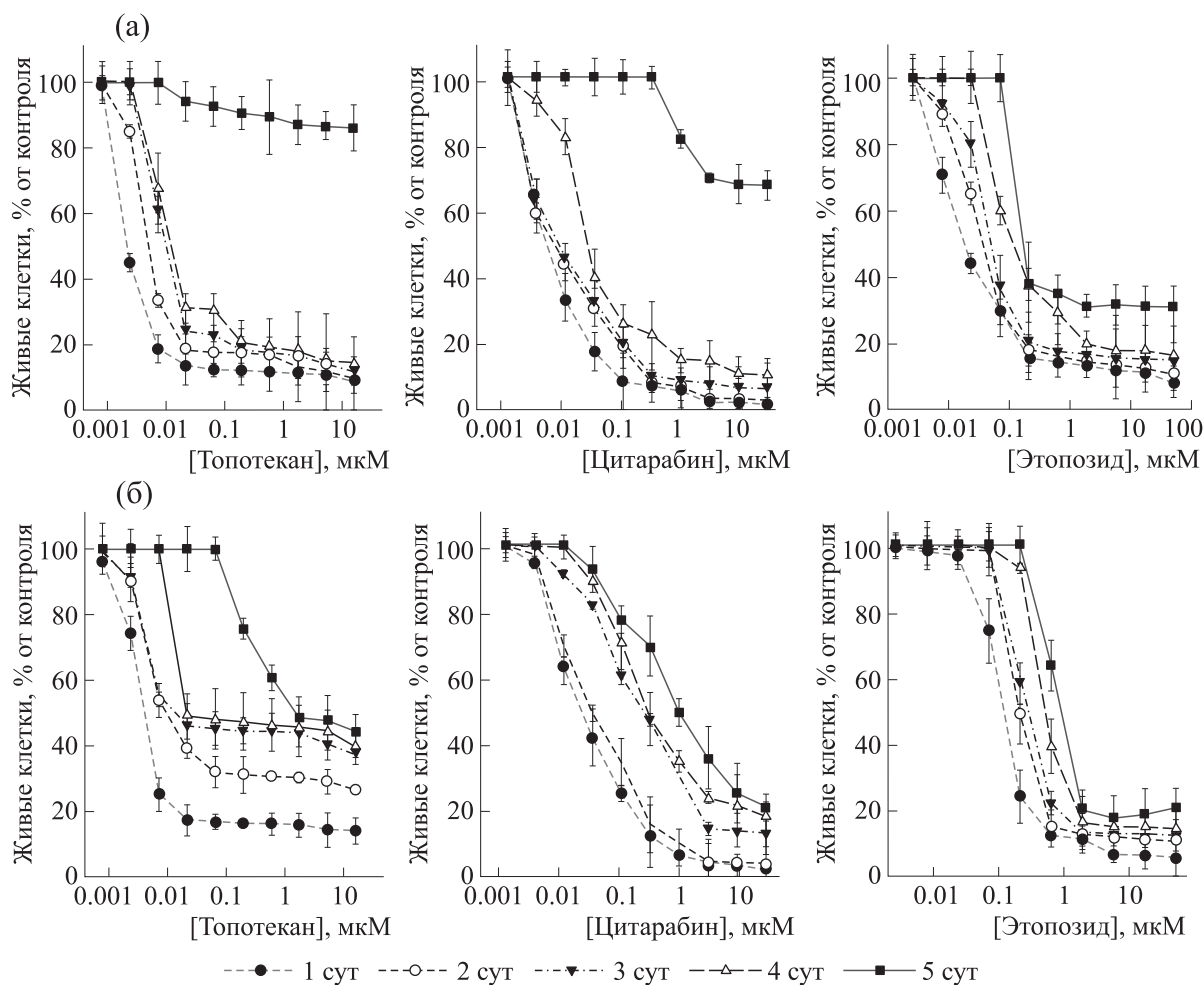


Рис. 2. Жизнеспособность клеток MOLT 3 (а) и MOLT 4 (б) после 24 ч инкубации с топотеканом, цитарабином и этопозидом, добавленных к культуре через 1, 2, 3, 4 и 5 суток от момента посева клеток. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($n \geq 3$).

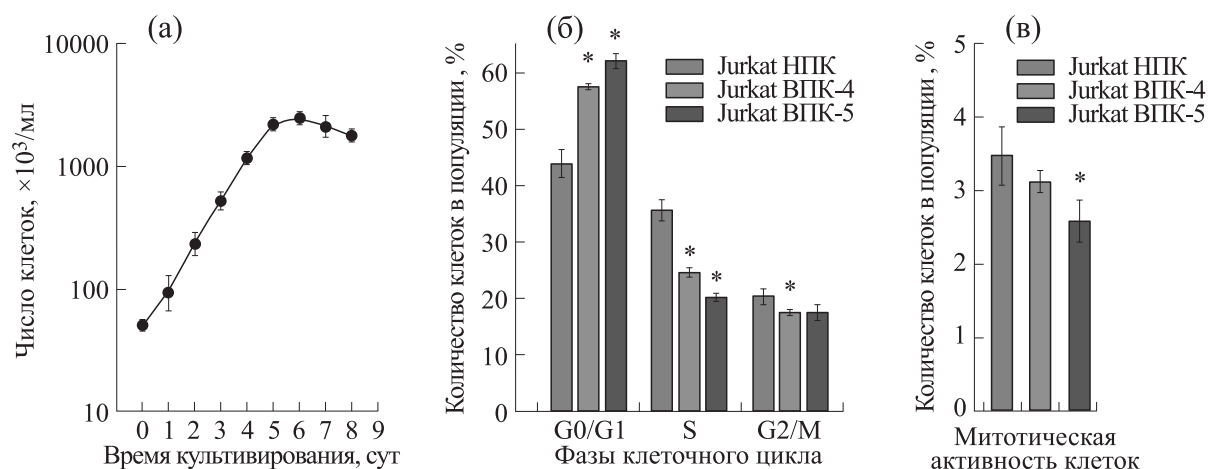


Рис. 3. Пролиферативная активность клеток Jurkat в высокоплотных клеточных культурах. Кривая роста (а), распределение по фазам клеточного цикла (б) и митотическая активность (в) клеток Jurkat в культурах низкой и высокой плотности. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($n \geq 3$); * — $p < 0.05$ в сравнении с клетками, культивированными 1 сутки.

Jurkat, поэтому все дальнейшие исследования проводили именно на этой клеточной линии.

Повышение лекарственной устойчивости клеток острого лимфоидного лейкоза Jurkat в высокоплотных клеточных культурах может опосредоваться изменением их пролиферативной активности. В ряде публикаций формирование резистентности у клеток солидных опухолей (карциномы, саркомы, глиомы и т.д.) в высокоплотных культурах (конфлюэнт, агрегат, сфероид) к противоопухолевым препаратам связывают с выходом клеточной культуры в стационарную фазу клеточного цикла и изменением пролиферативной активности [7, 8]. В связи с этим мы провели исследование пролиферативной активности клеток ОЛЛ Jurkat в высокоплотных клеточных культурах. Пролиферативную активность клеток оценивали по анализу кривой роста, распределению клеток по фазам клеточного цикла и митотической активности.

Анализ кривой роста клеточной линии Jurkat показал, что на 4-е сутки культивирования клетки находятся в экспоненциальной фазе, а на 5-е сутки выходят в стационарную фазу (рис. 3а). Дополнительно мы исследовали митотическую активность и распределение по фазам клеточного цикла клеток Jurkat, культивированных в течение 4 суток (далее ВПК-4с) и 5 суток (далее ВПК-5с), в сравнении с клетками, культивированными при низкой плотности клеточной культуры. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что количество клеток в популяции Jurkat ВПК-4с уменьшалось в S-фазе с $35.7 \pm 1.8\%$ до $24.7 \pm 0.6\%$ ($p < 0.05$) и в G2/M-фазе — с $20.3 \pm 1.4\%$ до $17.7 \pm 0.19\%$ ($p < 0.05$), увеличивалось в G0/G1-фазе с $43.9 \pm 2.4\%$ до $57.6 \pm 0.43\%$ ($p < 0.05$) и не изменялось в M-фазе относительно

клеток, культивируемых при низкой плотности культуры. В свою очередь, количество клеток в популяции Jurkat ВПК-5с увеличивалось в G0/G1-фазе с $43.9 \pm 2.4\%$ до $61.9 \pm 1.2\%$ ($p < 0.05$), уменьшалось в S-фазе с $35.7 \pm 1.8\%$ до $20.5 \pm 0.5\%$ ($p < 0.05$), не изменялось в G2/M-фазе и снижалось с $3.5 \pm 0.4\%$ до $2.6 \pm 0.3\%$ в M-фазе относительно клеток, культивируемых в культуре низкой плотности (рис. 3б).

Полученные данные указывают на то, что повышение лекарственной устойчивости клеток Jurkat в высокоплотных клеточных культурах может быть связано со снижением их пролиферативной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании показана возможность повышения устойчивости к действию химиотерапевтических препаратов у клеток острого лимфоидного лейкоза человека в высокоплотных клеточных культурах. Повышение лекарственной устойчивости клеток ОЛЛ в высокоплотных клеточных культурах может опосредоваться изменением их пролиферативной активности. Выяснение механизмов лекарственной устойчивости, опосредованной условиями микроокружения, важно для выявления новых фармакологических мишеней консервативной терапии направленного действия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания для ИТЭБ РАН (№ 075-00224-24-01).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terwilliger T. and Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.*, **7** (6), e577 (2017). DOI: 10.1038/bcj.2017.53
2. Ekpa Q. L., Akahara P. C., Anderson A. M., Adekoya O. O., Ajayi O. O., Alabi P. O., Okobi O. E., Jaiyeola O., and Ekanem M. S. A review of acute lymphocytic leukemia (ALL) in the pediatric population: evaluating current trends and changes in guidelines in the past decade. *Cureus*, **15** (12), e49930 (2023). DOI: 10.7759/cureus.49930
3. Inaba H. and Mullighan C. G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **105** (11), 2524–2539 (2020). DOI: 10.3324/haematol.2020.247031
4. Ma C., Witkowski M.T., Harris J., Dolgalev I., Sreeram S., Qian W., Tong J., Chen X., Aifantis I., and Chen W. Leukemia-on-a-chip: Dissecting the chemoresistance mechanisms in B cell acute lymphoblastic leukemia bone marrow niche. *Sci. Adv.*, **6**, eaba5536 (2020). DOI: 10.1126/sciadv.aba5536
5. Dander E., Palmi C., D'Amico G., and Cazzaniga G. The bone marrow niche in B-cell acute lymphoblastic leukemia: The role of microenvironment from pre-leukemia to overt leukemia. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (9), 4426 (2021). DOI: 10.3390/ijms22094426
6. Hoffbrand A. V. and Pettit J. E. *Clinical Hematology* (Mosby, Incorporated, 2000), vol. 2, p. 408.
7. Jo Y., Choi N., Kim K., Koo H. J., Choi J., and Kim H. N. Chemoresistance of cancer cells: requirements of tumor microenvironment-mimicking *in vitro* models in anti-cancer drug development. *Theragnostics*, **8** (19), 5259–5275 (2018). DOI: 10.7150/thno.29098
8. Sabelström H., Quigley D. A., Fenster T., Foster D. J., Fuchshuber C. A. M., Saxena S., Yuan E., Li N., Paterno F., Phillips J. J., James C. D., Norling B., Berger M. S., and Persson A. I. High density is a property of slow-cycling and treatment-resistant human glioblastoma cells. *Exp. Cell Res.*, **378** (1), 76–86 (2019). DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.03.003

Increased Drug Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells in Three-Dimensional High-Density Cell Cultures

D.Yu. Shtatnova*, M.I. Kobayakova*, **, Y.V. Lomovskaya*, E.I. Fetisova*, K.S. Krasnov*, and R.S. Fadeev*

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

**Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia

In this study, the development process of drug resistance in acute lymphoblastic leukemia cells (Jurkat, MOLT 3, and MOLT 4 cell lines) was examined in high-density cell cultures. It has been shown that in high-density cultures of acute lymphoblastic leukemia cells resistance to the action of chemotherapeutic drugs increases comparing to the cells cultured under low-density conditions. The results obtained after investigation of the mechanism underlying increased drug resistance in acute lymphoblastic leukemia cells in high-density cell cultures showed that an increase in drug resistance in high-density cultures of cells can be mediated by a change in their proliferative activity. These findings can be applied in developing a strategy to overcome drug resistance in acute lymphoblastic leukemia cells, which depends on the density of the cell culture.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, drug resistance, high-density cultures, proliferative activity