

## **ГИПЕРКАПНИЯ, КАК ИНДУКТОР ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КУЛЬТУРЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

**Смирнова Е.Н.**

**Научные руководители: к.б.н. доцент Субботина Т.Н., к.м.н. доцент  
Ольховский И.А.**

*Сибирский Федеральный Университет*

Культуры бластных клеток, от пациентов с онкогематологическими заболеваниями могут быть использованы для определения прогноза чувствительности к химиотерапии, риска развития резистентности и рецидива заболевания. Вместе с тем, известно, что локальные условия гипоксии и гиперкапнии у пациентов *in vivo* могут существенно влиять на пролиферативную активность опухолевых клеток и их чувствительность к цитостатикам. В последние годы с помощью микроэлектродной техники было показано, что рН опухоли более кислый, чем в окружающих тканях организма – носителя (речь идет о внеклеточном рН). Несмотря на то, что рН крови – жесткая константа (7,36 – 7,42) оптимальный рН для роста опухолевых клеток составляет 7,0-7,2, а максимальная пролиферация наблюдается при рН 6,8. При этом следует учитывать, что при достижении рН некоего критического уровня 6,5 – 6,0 даже приспособившаяся к «кислым условиям» злокачественная опухоль не сможет, вероятно, нормально существовать.

Цель работы - оценить влияния среды с кислым рН на пролиферативную активность и лекарственную чувствительность культуры опухолевых клеток. В задачи входило: моделирование условий для культивирования клеток линии Нек и бластных клеток пациентов с острым лейкозом в гиперкапнических условиях при сниженной рН среды, оценка пролиферативной активности лейкозных клеток с использованием проточного цитофлюориметра и проведение цитотоксического теста (МТТ – колориметрический тест).

Опухолевую прогрессию можно представить в виде схемы, включающую следующие события:

1. Усиленный гликолиз в опухолях изменяет микроокружение существенно снижая внутриопухолевый рНе (внеклеточный) — феномен, наблюдаемый в эксперименте.
2. Ионы водорода, продуцируемые опухолью, диффундируют вдоль градиентов концентрации в окружающие нормальные ткани.
3. Подкисление внеклеточного окружения служит преимуществом для опухоли, так как:  
а) индуцирует гибель нормальных клеток благодаря некрозу или активации р53-зависимого апоптотического пути; гибель нормальных клеток способствует образованию пространства, в котором опухолевые клетки могут пролиферировать; б) внеклеточный ацидоз способствует ангиогенезу через кислотоиндуцированную реализацию VEGF; в) ацидоз непрямо усиливает деградацию внеклеточного матрикса, «отдавая приказ» окружающим нормальным клеткам (фибробластам и макрофагам) продуцировать протеолитические ферменты; г) ацидоз ингибирует иммунные реакции организма на опухолевые антигены.

Выход протонов, инициирует гиперстимуляцию различных электрогенных мембранно-связанных H<sup>+</sup>-транспортеров, в первую очередь АТФ – зависимых транспортеров. Белки из семейства АВС-транспортеров (ATP Binding Cassette transporters, АТФ-

зависимые транспортеры) являются наиболее изученным фактором, определяющим наличие у клетки феномена множественной лекарственной устойчивости. Данная группа объединяет трансмембранные протеины, связывающие АТФ и использующие энергию для транспортировки некоторых молекул через все виды клеточных мембран. Семейство подразделяется на подсемейства А, В, С, D, E, F, и G в зависимости от структуры АТФ-связывающих доменов и в настоящее время насчитывает около 50 белков, 4 из которых имеют значение в развитии феномена МЛУ при ОМЛ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили бластные клетки от пациентов с острым лейкозом. Лейкоциты, выделенные из цельной крови (взятой до назначения лечения), культивировали в течение 48 ч. в полной питательной среде RPMI-1640 (L-глутамин - 2 ммоль, пенициллина - 100 ЕД/мл, стрептомицина - 100 ЕД/мл, NEPES – 25 ммоль, ЭТС - 10%, NaHCO<sub>3</sub> – 2г/л) в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub> (рН 7,2). После чего часть из них переносили в инкубатор с 10% CO<sub>2</sub> (рН 6,8). Через 48, 72 и 96 ч. оценивали пролиферативную активность. Подготовку проб осуществляли по протоколу: фиксация – отмывка – лизис РНК. После добавления красителя пропидиум иодида (50мкг/мл) осуществляли анализ на цитофлуориметре BD FACSCanto™ II. В качестве контроля использованы клетки линии hek 293.

При проведении цитотоксического теста линейные клетки hek 293 инкубировали в отсутствии (контроль) или в присутствии различных концентраций даунорубина в разных инкубаторах (рН 6,8 и 7,2). После 48 ч культивирования клеток и исследуемых препаратов в питательной среде при 37° С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, в каждую лунку добавили 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ). Через 4 ч экспозиции при 37° С живые клетки восстанавливают желтый МТТ до темно-фиолетовых гранул формазана. Гранулы формазана растворяются в диметилсульфоксиде (ДМСО), количество восстановленного продукта измеряли на микропланшетном анализаторе (фотометре) Ридер 680 (BioRad) при длине волны 540 нм. LD<sub>50</sub> рассчитывали графически по дозозависимой кривой. Обработку и анализ полученных данных проводили с помощью стандартной прикладной программы Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки различий в пролиферативной активности использовали индекс ДНК. Это отношение количества ДНК в первом пике G0/G1 для лейкозных клеток к количеству ДНК в нормальных клетках (принимают за 100).

Таблица 1. Индекс ДНК в нормальных и гиперкапнических условиях.

№	48 ч.		72 ч.		96 ч.	
	5% CO <sub>2</sub>	10% CO <sub>2</sub>	5% CO <sub>2</sub>	10% CO <sub>2</sub>	5% CO <sub>2</sub>	10% CO <sub>2</sub>
hek	0,70	1,50	0,75	1,99	1,55	1,62
1	2,01	2,25	1,00	1,60	1,05	1,70
2	1,10	0,85	1,30	1,75	0,85	0,60
3	0,80	0,90	0,90	1,10	1,10	1,05
4	1,00	1,05	0,90	0,95	0,52	0,47
5	0,20	0,40	0,30	1,20	1,36	1,33
6	0,20	0,35	1,30	1,35	0,52	0,45
7	1,10	0,90	1,15	1,20	1,30	1,40

В большинстве случаев, пролиферативная активность возрастает в условиях гиперкапнии (рН 6,8) и достигает максимума на 3 сутки культивирования. При дальнейшем культивировании различия снижаются. Возможно, это связано с

истощением среды в процессе культивирования. Либо рН достигает некоего критического уровня, при котором клетки уже не могут нормально существовать.

Выживаемость клеток в среде с различными концентрациями даунорубицина рассчитывали по формуле:

$(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды} / \text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$ ,

где ОП — оптическая плотность.

Таблица 2. Процент выживаемости клеток hek в нормальных и гиперкапнических условиях

	0,5	1	1,5	2	2,5	3
рН 7,2	58	57	56	32	9	0
рН 6,8	93	53	40	3	2	0

LD<sub>50</sub> для даунорубицина в нормальных условиях составила 0,70мкг/мл и 1,75 мкг/мл в условиях гиперкапнии.

## ВЫВОДЫ

Культивирование опухолевых клеток в условиях гиперкапнии увеличивает пролиферативную активность клеток от разных пациентов в различной степени; также наблюдается повышенная резистентность к цитостатику. Оценку гиперкапнического стимула пролиферативной активности можно предложить в качестве прогностического теста определения индивидуальных особенностей развития заболевания.