

УДК 576.385.5

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИИ УСТОЙЧИВЫХ К ЦИСПЛАТИНУ КЛЕТОК РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. В. Моршнева¹ *, О. О. Гнедина¹, Д. Н. Киндт¹, М. В. Игotti¹

¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: amorphneva@incras.ru

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 05.04.2022 г.

Принята к публикации 20.04.2022 г.

Важным этапом исследований, посвященных анализу механизмов опухолевого рецидива и лекарственной устойчивости, является получение модельных линий опухолевых клеток, устойчивых к интересующему препарату. В представленной работе описан процесс получения линии клеток рака толстой кишки НСТ116, устойчивых к цисплатину, и дана характеристика некоторых параметров устойчивых клеток, включая оценку пролиферативной, метаболической и миграционной активности. Результаты исследований показывают, что полученная линия НСТ116/С обладает более чем 30-кратной устойчивостью к цисплатину по сравнению с исходными клетками. Таким образом, в результате нашей работы была создана *in vitro* модель резистентности к цисплатину клеток колоректального рака, которая открывает возможности для будущих исследований по преодолению лекарственной устойчивости *in vitro* и поиска новых подходов противораковой терапии *in vivo*.

Ключевые слова: онкология, колоректальный рак, хеморезистентность, рецидивирование, устойчивые клетки, цисплатин

DOI: 10.31857/S0041377122040022

Колоректальный рак – одна из наиболее агрессивных и трудно поддающихся лечению форм рака. Особенно остро в терапии колоректального рака стоит проблема рецидивирования опухолей, которая тесно связана с проблемой лекарственной устойчивости, приобретаемой опухолевыми клетками в ходе лечения. В этом случае часть опухолевых клеток выживает, формируя новую опухоль, более устойчивую к действию терапевтических препаратов. При этом опухолевые клетки, сформировавшие устойчивость к одному цитостатику, часто проявляют пониженную чувствительность и к ряду других препаратов – явление, известное как перекрестная устойчивость или кросс-резистентность (Gupta et al., 1988). Проблема развития лекарственной устойчивости часто возникает при терапии препаратами платины, до сих пор активно используемыми в химиотерапии колоректального рака (Dilruba, Kalayda, 2016). Изучение механизмов, лежащих в основе формирования этой устойчивости и поиск способов ее преодоления, часто проводится *in vitro* на клеточных моделях, включающих чувствительные и устойчивые к препарату интереса линии клеток.

Основными задачами настоящей работы являются получение и характеристика такой клеточной модели – чувствительных и устойчивых к цисплатину клеток колоректального рака человека НСТ116. Ци-

сплатин – химиотерапевтический препарат на основе платины, который активно используется в клинике для борьбы с различными злокачественными новообразованиями (Dasari, Tchounwou, 2014). Цисплатин вызывает перекрестные сшивки с пуриновыми основаниями ДНК, нарушая процессы ее репарации, что впоследствии приводит к гибели раковых клеток (Galluzzi et al., 2012; Dasari, Tchounwou, 2014).

Устойчивые к различным препаратам клетки колоректального рака широко представлены в литературе. Схемы обработки клеток цитостатиком могут отличаться периодичностью времени действия агента – постоянное или импульсное (эпизодическое), также может варьировать дозировка препарата – фиксированная или возрастающая. В стратегиях с постоянным присутствием цитостатика в культуральной среде используют более низкие концентрации агента, тогда как стратегии импульсного воздействия позволяют проводить обработку клеток цитостатиком в высоких дозировках, чередуя воздействие с периодами восстановления на чистой культуральной среде.

На основе клеток колоректального рака человека были получены линии, устойчивые к различным препаратам, используемым в клинической практике. Устойчивые к доксорубину клетки линии НСТ115 были получены при непрерывном воздей-

ствии постепенно увеличивающейся концентрации доксорубина от 0.5 до 55 мкг/мл в течение 13 мес., после чего клетки переводили на чистую среду и проверяли на устойчивость (Choi et al., 1996). При альтернативном подходе (Fanciulli et al., 2000) доксорубин-устойчивые линии клеток рака толстого кишечника LoVo получали, подвергая исходные клетки кратковременной (в течение 1 ч) обработке доксорубином в повышенной концентрации (10 мкг/мл) с последующим выращиванием клеток в редкой плотности (500 клеток на 60-мм чашку) в среде, не содержащей доксорубин. Через 2 нед. выделяли устойчивые колонии и выращивали до монослоя для следующей кратковременной обработки. По истечении 12 циклов обработки доксорубином в течение 7 мес. полученные устойчивые клетки постоянно поддерживали в культуральной среде в присутствии 10 мкг/мл доксорубина. Показатель IC₅₀ для чувствительных клеток составлял 0.03 мкг/мл, тогда как для устойчивых клеток – 5.7 мкг/мл (Fanciulli et al., 2000).

Существуют исследования, показывающие, что одни и те же родительские клетки при применении различных способов индукции устойчивости к лекарству могут дать линии с различающимися характеристиками. Так, клетки AdR1.2 были получены при длительном непрерывном воздействии доксорубина на клетки LoVo со ступенчатым повышением концентрации от 0.01 до 1.2 мкг/мл в течение 16 мес. с последующим постоянным поддержанием ее 1.2 мкг/мл, тогда как клетки SRA1.2 были получены из LoVo с помощью процедуры, состоящей из девяти импульсных коротких (в течение 1 ч) лекарственных циклов с высокой концентрацией доксорубина (1.2 мкг/мл) в течение 9 мес., по окончании чего резистентные клетки SRA1.2 выращивали в среде без доксорубина. Обе устойчивые сублинии были перекрестно устойчивы и перекрестно чувствительны к одинаковому спектру цитотоксических агентов. Однако есть ряд различий, среди которых обратимость устойчивого фенотипа у клеток AdK1.2 при выращивании клеток в среде без лекарства, тогда как SRA1.2 сохраняли свою устойчивость в течение не менее 10 мес. в аналогичных условиях (Yang, Trujillo, 1990).

Примерно 47-кратная устойчивость к иринотекану развивалась в клетках рака толстой кишки S1 при импульсном воздействии агентом (0.5 мкМ) в течение 48 ч с перерывом на 7 сут (Wu et al., 2021). После 3–5 циклов лекарственной обработки клетки культивировали с возрастающими концентрациями иринотекана, каждый раз увеличивая их на 50%. Устойчивые клеточные линии экспоненциально росли в присутствии 20 мкМ иринотекана. Для дальнейшего использования полученные устойчивые клетки выдерживали в среде, не содержащей лекарственного средства, в течение 14 сут перед экспериментом (Wu et al., 2021).

Для создания *in vitro* устойчивой к оксалиплатину клеточной линии карциномы толстой кишки (Tang et al., 2007) исходные чувствительные клетки ТНС8307 подвергали продолжительному воздействию оксалиплатина в концентрации 0.108 мкг/мл с постепенным увеличением концентрации препарата через каждые 2 нед. непрерывной обработки до конечной концентрации 6 мкг/мл в течение 9 мес. Стабильно устойчивую клеточную линию культивировали в присутствии конечной концентрации оксалиплатина еще на протяжении 4-х мес. Перед дальнейшим анализом резистентную линию раковых клеток поддерживали в течение 1 нед. без лекарств для устранения острых эффектов. Полученная линия была в 31 раз более устойчива к оксалиплатину, чем исходные клетки (Tang et al., 2007). По подобному сценарию получали оксалиплатин-устойчивые линии на основе клеток колоректального рака SW620 и LoVo при непрерывном воздействии оксалиплатина в низкой концентрации с постепенным ее увеличением в течение 10 мес. (Liu et al., 2010).

Устойчивую к цисплатину линию карциномы (CC531) толстой кишки крысы получали *in vitro* при непрерывном присутствии в среде клеток цисплатина в низкой концентрации (0.75 мкМ), на которой продолжали поддерживать установившиеся устойчивые клоны (Vrie et al., 1993). Таким же образом индуцировали устойчивость к цисплатину клеток рака толстой кишки человека LoVo, поэтапно обрабатывая их агентом для отбора устойчивых клонов, которые затем были объединены для последующих экспериментов (Chen et al., 2021).

Для развития устойчивости к 5-фторурацилу (5-FU), оксалиплатину и иринотекану клетки линии колоректального рака НСТ116 подвергались повторяющейся обработке препаратов в постепенно возрастающих концентрациях в течение более 10 мес. (Boyer et al., 2004). Устойчивую к 5-фторурацилу линию затем культивировали в присутствии 2 мкМ 5-FU, иринотекан-устойчивую линию – в присутствии 1 мкМ иринотекана, а оксалиплатин-устойчивая линия была оценена как стабильно устойчивая и велась на среде без вещества с импульсными обработками оксалиплатином (8 мкМ) каждые 4 нед. Перед каждым экспериментом устойчивые линии культивировали в среде без препарата в течение 48 ч. Концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) в устойчивых к 5-FU, оксалиплатину и иринотекану линиях были выше в 3, 31 и 10 раз соответственно относительно родительских чувствительных клеточных линий (Boyer et al., 2004).

Линии, устойчивые к цитотоксическому воздействию, являются незаменимым модельным объектом в исследованиях механизмов лекарственной устойчивости клеток колоректального рака и причин его рецидивирования.

В представленной работе описано реализованное нашей исследовательской группой получение линии устойчивых к цисплатину клеток колоректального рака человека при итеративной обработке исходных клеток НСТ116 цисплатином, а также приведены результаты экспериментов, подтверждающих устойчивость полученной линии к цисплатину. Работа проведена на базе Института цитологии РАН. За стартовую была взята определенная нами методом МТТ концентрация полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток, составившая 9 мкМ. Клетки, полученные после нескольких циклов обработки цисплатином в возрастающей концентрации, показали высокую степень резистентности и не снижают жизнеспособность при действии 50 мкМ цисплатина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии и культивирование клеток. Клетки рака прямой кишки человека НСТ116 были любезно предоставлены О.Н. Демидовым (Университет Бургундии Франш-Конте, Безансон, Франш-Конте, Франция). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде DMEM (Биолот, Россия), дополненной 10% сыворотки (FCS; Gibco, США), 2 мМ L-глутамина (Биолот, Россия) и содержащей 40 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия). В ходе работы на основе линии НСТ116 были получены устойчивые к цисплатину клоны (линия НСТ116/С).

Тест МТТ. Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью колориметрического теста МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид), позволяющего количественно измерять метаболическую активность клеток. МТТ — это желтый тетразолевый краситель, который проникает в клетку и под действием НАДФН-зависимых оксидоредуктазных ферментов, восстанавливается до нерастворимого соединения формазана, который затем переводится в растворимое состояние с помощью диметилсульфоксида (ДМСО).

Для проведения теста клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в плотности 30×10^3 клеток на 1 лунку и культивировали в присутствии цисплатина в соответствующей концентрации в течение 24–72 ч, после чего культуральную среду удаляли, а клетки инкубировали в растворе МТТ (Sigma) в PBS в конечной концентрации 0.5 мг/мл в течение 1 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. Затем раствор МТТ убирали и лизировали клетки в ДМСО до растворения гранул формазана. Оптическую плотность раствора в каждой лунке определяли спектрофотометрически при длине волны 570 нм (Multiscan-EX; Labsystems, США), используя величину оптической плотности ДМСО в качестве референсного значения. Абсолютные значения оптической плотности, прямо пропорциональные интенсивности клеточного дыхания и, соответственно, жизнеспособности клеток, в каждой временной точке пересчитывали относительно

контрольных необработанных цисплатином клеток, принимаемых за единицу, и представляли на графиках в относительных значениях.

Показатель IC50 и индекс устойчивости (RI). Вычисление IC50 цисплатина (его концентрации полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток) проводили с помощью веб-инструмента AAT Bioquest, Inc. (Quest Graph™ IC50 Calculator; <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) на основе результатов теста МТТ, представленных в виде таблицы, где каждой концентрации цисплатина соответствует усредненное и нормированное на контроль (относительное) значение поглощения МТТ (570 нм). Индекс устойчивости (RI) вычисляли как отношение IC50 устойчивых клонов к IC50 исходных чувствительных клеток ($RI = IC50_{\text{НСТ116/С}}/IC50_{\text{НСТ116}}$).

Кривые роста клеток. Клетки рассеивали на чашки 3 см в плотности 80×10^3 клеток на чашку. Через 24 ч после посева к клеткам добавляли цисплатин в концентрации 18 мкМ и, спустя 24, 48 и 72 ч после добавления агента, проводили подсчет общего числа клеток в каждой экспериментальной точке с использованием камеры Горяева. Для каждой экспериментальной точки клетки в чашке считали трижды. Данные представляли как среднее значение и его стандартная ошибка в каждой временной точке.

Тест на заращение царапины. Для проведения теста на миграционную активность в монослое клеток (12-луночный планшет) проводили прямые царапины с помощью наконечника дозатора на 200 мкл. Фоторегистрацию царапины проводили в момент и через 24 ч после нанесения царапин с помощью инвертированного светового микроскопа. Для обработки изображений и вычисления площади царапины использовали программу Image J (Schneider et al., 2012).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор стартовой концентрации цисплатина для получения устойчивых клонов. В представленной работе устойчивые к цисплатину клетки колоректального рака человека на основе линии НСТ116 были получены при циклической обработке исходных клеток возрастающими концентрациями цисплатина. Для выбора стартовой концентрации цитотоксического агента провели тест МТТ, оценив жизнеспособность родительских клеток НСТ116 при действии возрастающих концентраций цисплатина (рис. 1а, в). На основе полученных данных была рассчитана концентрация цисплатина, соответствующая концентрации IC50 для каждой временной точки (рис. 1б). Чтобы сбалансировать интенсивность клеточной гибели на начальных этапах получения устойчивых клонов, в качестве стартовой была выбрана концентрация 9 мкМ, соответствующая IC50 в точке 48 ч.

Получение устойчивой к цисплатину линии клеток НСТ116/С. На рис. 2 схематично представлен процесс индукции устойчивости клеток к цисплатину,

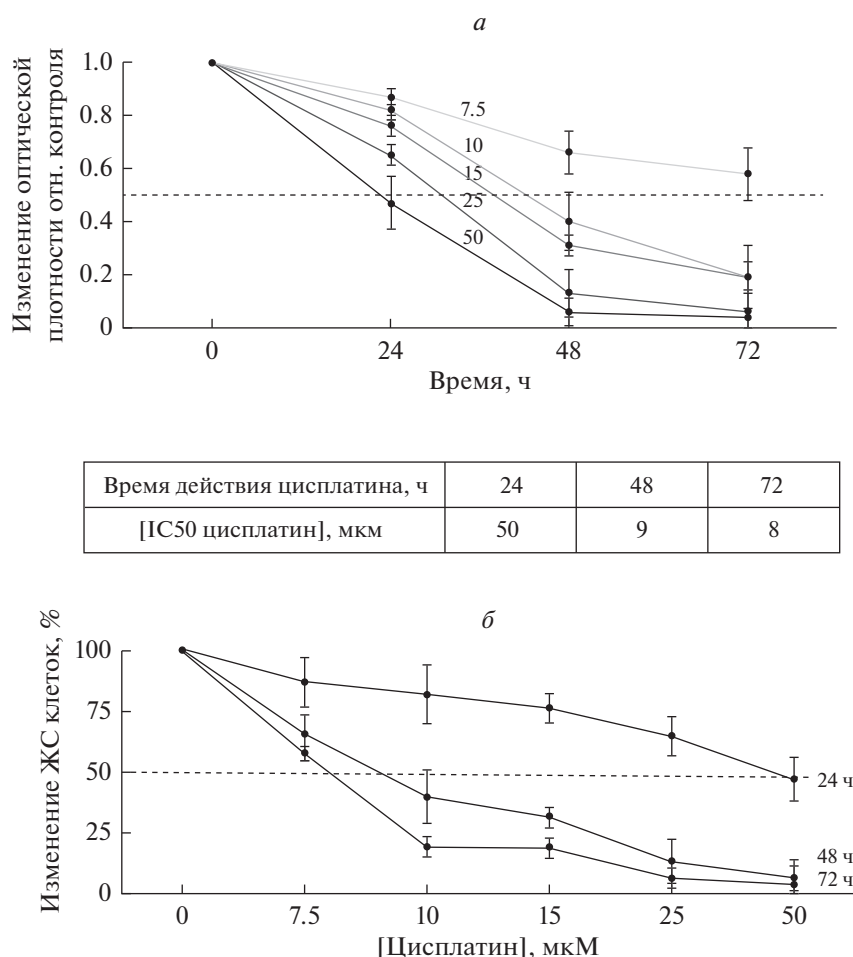


Рис. 1. Зависимость изменения жизнеспособности (ЖС) клеток НСТ116 при действии цисплатина в различных концентрациях в течение 24–72 ч согласно результатам теста МТТ. Результаты теста представлены в виде графика изменения оптической плотности, прямо пропорциональной ЖС клеток (*a*), и графика изменения (%) ЖС клеток (*b*) при действии цисплатина на временных точках 24–72 ч. Цифры над кривыми (*a*) – концентрация цисплатина, мкМ. Результаты представлены относительно значений для контрольных необработанных цисплатином клеток в каждой временной точке, принятых за единицу (*a*), или 100% (*b*). Горизонтальная линия на графиках (*a*, *b*) соответствуют IC50 (концентрации цисплатина для полумаксимального подавления ЖС); точные значения IC50, рассчитанные для каждой временной точки, приведены в таблице (*b*). На графиках представлен результат усреднения 3–5 независимых экспериментов, вертикальные отрезки – стандартные ошибки среднего (SEM).

примененной в представленной работе (рис. 2). Для получения устойчивых клонов исходные клетки НСТ116 подвергали последовательным циклам обработки цисплатином в возрастающей концентрации. Клетки обрабатывали цисплатином в стартовой концентрации (9 мкМ), подобранной, как описано выше, в течение 24 ч. Спустя 24 ч действия агента среду меняли на свежую, не содержащую цисплатин. После периода восстановления продолжительностью 2–3 нед. образовавшиеся колонии собирали 0.5%-ным раствором трипсина–ЭДТА. Полученные таким образом клетки выращивали в виде монослойной культуры до сливания колоний, а затем подвергались еще одному циклу обработки цисплатином по описанной выше методике.

После 2–3-х циклов обработки определяли индекс устойчивости клеток (RI) для того, чтобы принять решение об увеличении концентрации цитотоксического агента. RI является важным параметром оценки степени устойчивости клеток к химическому или физическому воздействию и широко используется при получении резистентных клеточных линий (Zhang et al., 2006). Принято считать, что клетки с RI в пределах 0–2 все еще считаются чувствительными, тогда как устойчивость средней степени характеризуется значением RI в диапазоне значений 2–10, превышение которого (RI > 10) говорит о высокой устойчивости клеток (Harker et al., 1989; Michalak et al., 2020). При удвоении RI нами принималось решение о повышении концентрации цисплатина вдвое для следующего цикла обработки клеток.

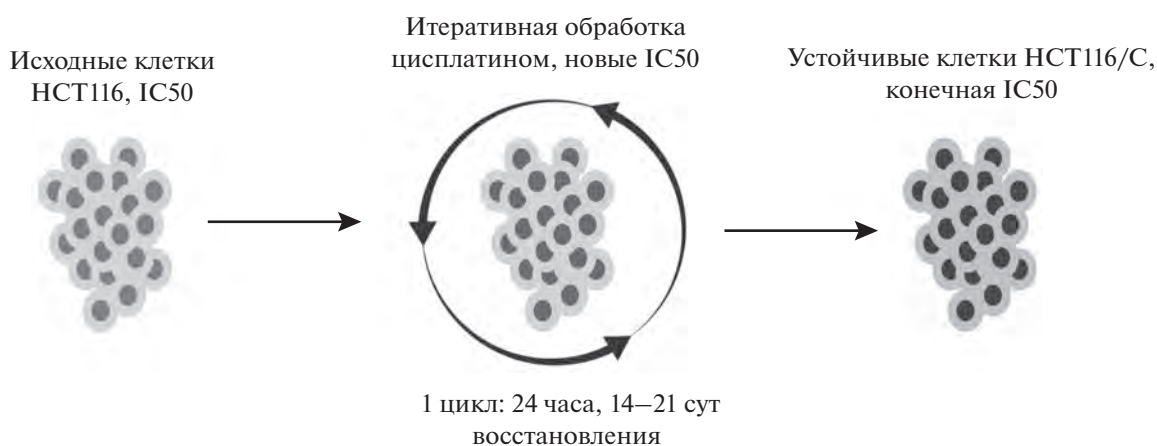


Рис. 2. Схема получения устойчивых к цисплатину клеток НСТ116 (*a*) и кривые жизнеспособности (*b*) чувствительных (НСТ116) и устойчивых (НСТ116/С) клеток после 4–6 циклов обработки цисплатином (10–50 мкМ) в течение 48 ч. *a* – Исходные клетки подвергали итеративной обработке цисплатином в возрастающих концентрациях (9, 18 и 40 мкМ); концентрацию цисплатина удваивали после каждого удвоения значения IC50 по мере приобретения клетками устойчивости. *b* – По данным МТТ-теста; значение для контроля (необработанных клеток) принято за единицу для каждой клеточной линии.

Для определения RI проводили перерасчет IC50 устойчивых клонов по результатам МТТ-теста, и вычисляли индекс устойчивости RI, как отношение IC50 устойчивых и чувствительных клеток ($RI = IC50_{\text{НСТ116/С}}/IC50_{\text{НСТ116}}$). Концентрацию цисплатина для обработки клеток удваивали при каждом удвоении RI.

Данные МТТ-теста показали, что IC50 после одного цикла обработки цисплатином в концентрации 9 мкМ, увеличилась до 12.5 мкМ, в результате чего индекс устойчивости RI составил 1.4. Такой показатель RI указывает на сохраняющуюся чувствительность клеток. В связи с этим проводили второй цикл обработки цисплатином с теми же условиями, что и первый. После второго цикла показатель RI превысил 2, в связи с чем концентрацию цисплатина повысили до 18 мкМ. После 2–3-х циклов действия цисплатина в концентрации 18 мкМ индекс RI отдельных клонов был выше 14, что свидетельствует о формировании высокой устойчивости. Далее обработку цисплатином продолжали при его концентрации 40 мкМ.

Данные МТТ-теста показывают, что после 4–6 циклов обработки цисплатином в возрастающей концентрации клетки выдерживают до 48 ч действия цисплатина, не достигая полумаксимального ингибирования жизнеспособности ни на одной из выбранных концентраций (рис. 3). Более того, определяемая с помощью МТТ-теста IC50 клеток после шестого цикла была значительно выше IC50 родительских клеток и составила 250 мкМ, что соответствует индексу устойчивости $RI = 27.8$.

Таким образом, за 6–7 циклов обработки исходных клеток НСТ116 цисплатином в возрастающей концентрации (9–40 мкМ) сформировалась 30-кратная устойчивость.

Сравнительная характеристика скорости пролиферации клеток линий НСТ116 и НСТ116/С.

Пониженная чувствительность клеток к цитотоксическому воздействию может быть обусловлена низкой пролиферативной активностью клеток. Для того, чтобы выяснить, не является ли наблюдаемое снижение чувствительности клеток НСТ116/С к цисплатину следствием снижения темпа пролиферации, мы провели сравнительный анализ скорости деления устойчивых и чувствительных клеток. Для этого строили кривые роста исходных клеток НСТ116, а также устойчивых клеток НСТ116/С, сформированных после 7-го цикла действия цисплатина. Данные, представленные на рис. 3*a*, свидетельствуют, что в клетках НСТ116/С скорость пролиферации существенно не снижена и практически совпадает с пролиферативной активностью родительских клеток НСТ116 (рис. 4*a*).

Далее было проведено сравнение влияния цисплатина на пролиферацию исходных и чувствительных клеток. Данные кривых роста показывают, что при культивировании в присутствии 18 мкМ цисплатина чувствительных клеток НСТ116 исходный размер популяции сокращается более чем вдвое к 72 ч действия агента, что свидетельствует об индукции клеточной гибели (рис. 4*b*). Увеличение популяции устойчивых клеток НСТ116/С замедляется в присутствии цисплатина, однако не происходит такого сокращения популяции, как в чувствительных клетках (рис. 4*в*). По данным кривых роста можно утверждать, что исходные клетки линии НСТ116 гибнут более интенсивно по сравнению с полученной резистентной линией, поскольку при действии цисплатина в течение 72 ч число клеток в линии НСТ116 в 15 раз меньше по сравнению с контролем, тогда как в линии НСТ116/С – только в 3 раза (рис. 4*г–д*), что

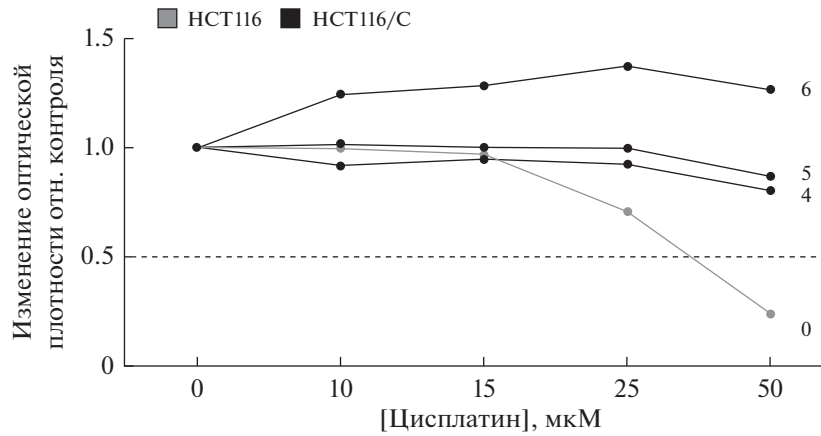


Рис. 3. Графики изменения жизнеспособности чувствительных (HCT116) и устойчивых (HCT116/C) клеток после 4–6-ого цикла обработки цисплатином (10–50 мкМ) в течение 48 ч. Данные представлены относительно необработанного цисплатином контроля, принятого за единицу для каждой клеточной линии. Цифры справа от кривых – число циклов цисплатина.

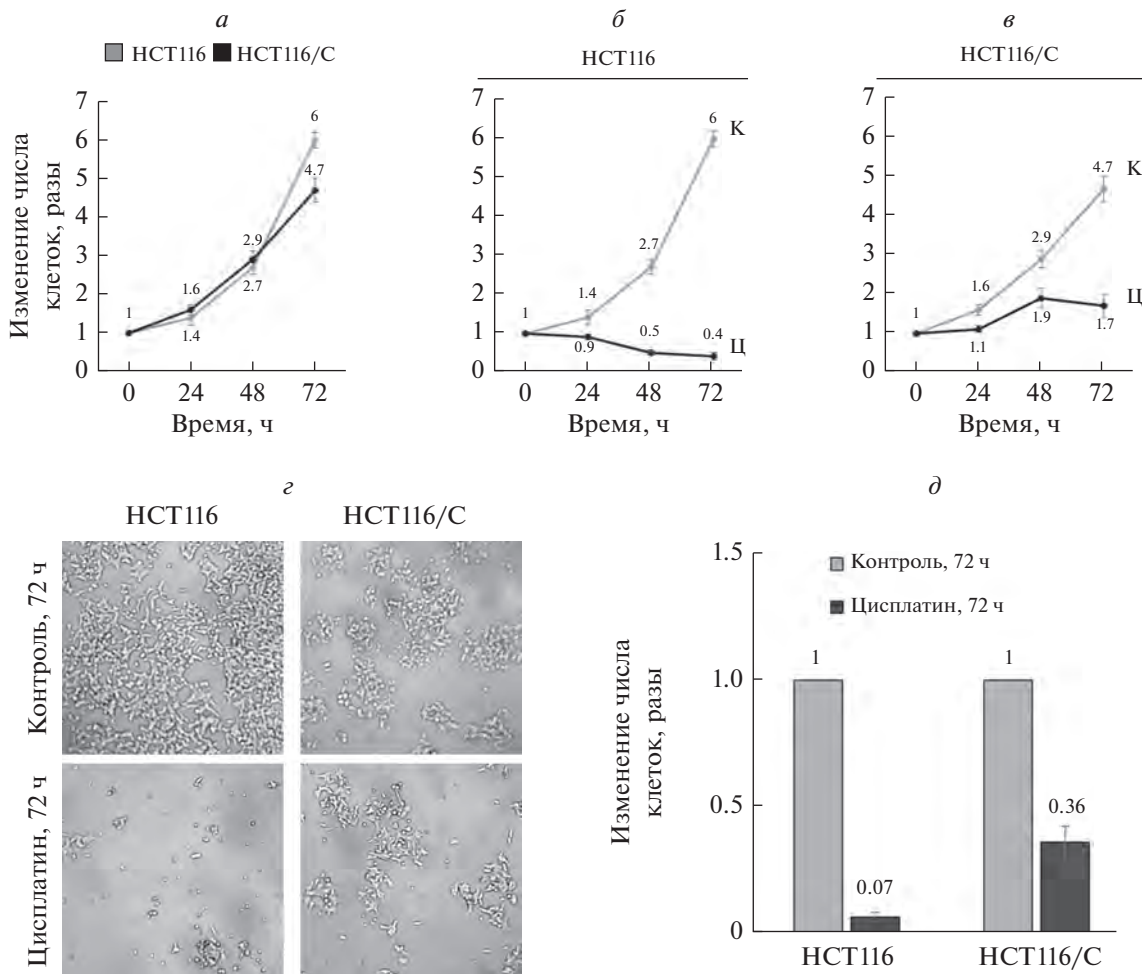


Рис. 4. Кривые роста популяции клеток HCT116 и HCT116/C в контроле и после обработки цисплатином (а–в), микрофотографии (е) и численность (д) их популяций. а – Изменение относительного количества чувствительных (HCT116) и устойчивых клеток (HCT116/C) при культивировании в среде без цисплатина в течение 24–72 ч. б, в – Изменение относительного количества соответственно исходных и устойчивых клеток в контроле (К) и при действии 18 мкМ цисплатина (Ц) в течение 24–72 ч; результаты представлены как отношение числа клеток в текущий момент к исходному числу клеток в день добавления агента, принятого за 1 для каждой клеточной линии. г – Репрезентативные фотографии клеток HCT116 и HCT116/C, необработанных или обработанных цисплатином (18 мкМ) в течение 72 ч. д – Численность популяций клеток HCT116 и HCT116/C, необработанных или обработанных цисплатином (18 мкМ) в течение 72 ч (на основе кривой роста). Численность популяции в контроле в точке 72 ч принята за единицу для каждой из линий, ее величины относительно соответствующего контроля указаны над столбцами. Вертикальные отрезки – стандартная ошибка среднего (SEM).

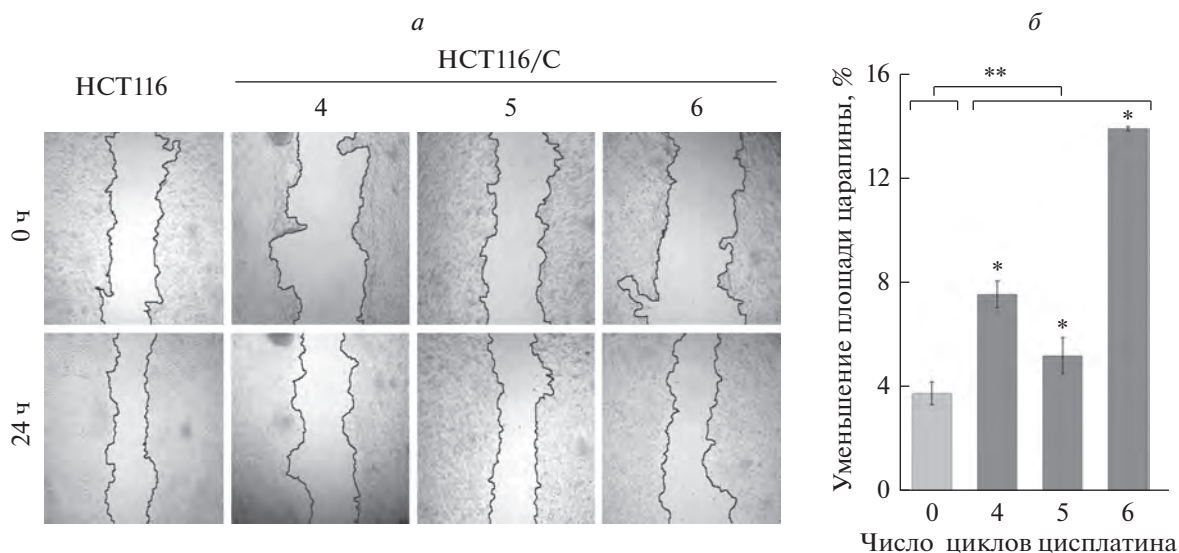


Рис. 5. Изменение площади заращения царапины в монослое клеток. *а* – Репрезентативные микрофотографии царапин в монослое чувствительных (HCT116) и устойчивых (HCT116/C) клеток после 4–6 циклов обработки цисплатином сразу (0 ч) и спустя 24 ч после нанесения царапины. *б* – Изменение площади царапины при ее зарастании клетками вычисляли как отношение площади царапины через 24 ч к площади через 0 ч после повреждения (%). Для вычисления площади царапин использовали программу Image J. На гистограмме представлен результат усреднения трех независимых экспериментов для чувствительных (светлый столбик) и устойчивых (темные столбики) клеток, вертикальные отрезки – стандартная ошибка среднего (SEM). Для проверки значимости различий использовали тест Манна–Уитни для сравнения с чувствительными клетками каждый из устойчивых клонов попарно (* $P < 0.05$), а также группу устойчивых клонов (** $P = 0.01$).

также свидетельствует о приобретении устойчивости полученной популяции к цисплатину.

Изменение миграционной активности клеток HCT116 при приобретении устойчивости к цисплатину. Для измерения основных параметров миграционной активности клеток, таких как скорость, постоянство и полярность используют тест на “зарастание царапины” или раны. В ходе эксперимента анализировали царапины в монослое чувствительных (HCT116) и устойчивых (HCT116/C) клеток после 4–6 циклов обработки цисплатином в двух временных точках: непосредственно после нанесения царапины (0 ч) и через 24 ч. На репрезентативных микрофотографиях царапин клеточного монослоя (24 ч после начала эксперимента) видно, что устойчивые клоны проявляют повышенную миграционную активность по сравнению с исходными клетками (рис. 5).

Таким образом, анализ *in vitro* показал более высокую миграционную способность химиорезистентных клеток HCT116 при анализе миграции во время заживлении раны. Это может указывать на то, что при приобретении устойчивости клетки претерпевают эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП), что увеличивает их способность к миграции.

Способность клеток мигрировать необходима для многих физиологических процессов, включая эмбриональное развитие, заживление ран. Тем не менее, миграция клеток также участвует в ряде патоло-

гических процессов, таких как инвазия опухоли, неоангиогенез и метастазирование.

Метастазирование неразрывно связано с устойчивостью к химиотерапии как клинически, так и биологически, однако молекулярная основа этой связи неизвестна. Существуют исследования, свидетельствующие о том, что развитие химиорезистентности сопровождается приобретением метастатического фенотипа и, соответственно, увеличенной миграционной активностью. Так, миграционная активность клеток аденокарциномы толстой кишки человека HT-29, устойчивых к 5-фторурацилу (5-FU), была выше по сравнению с родительскими при культивировании в присутствии 5-FU (Durinikova et al., 2018). Кроме того, показано, что цисплатин-резистентные клетки рака яичников IGROV1-CP обладают более высокими миграционными свойствами по сравнению с родительскими из-за дерегуляции ZEB1 (Cui et al., 2018), а также из-за их способности к быстрой регуляции фокальной адгезии через паксиллин, винкулин и талин (Huang et al., 2020). Следовательно, приобретение клетками химиорезистентности может приводить к повышению их миграционного потенциала, что согласуется с нашими данными, полученными в настоящей работе для цисплатин-устойчивых клеток.

Один из возможных механизмов устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию

лекарств заключается в замедлении пролиферации опухолевых клеток, снижении их метаболической активности (уход в состояние покоя или сна). Однако представленные нами данные указывают, что полученные устойчивые клетки имеют сравнимый с родительскими пролиферативный потенциал и являются метаболически активными. Таким образом, можно заключить, что в реализацию наблюдаемой в клетках НСТ116/С устойчивости к цисплатину вовлечены специфические механизмы химиорезистентности. Установление этих механизмов требует дополнительных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке правительства Санкт-Петербурга и частично Фондом директора Института цитологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах представленной работы животные и люди не участвовали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boyer J., McLean E.G., Aroori S., Wilson P., McCulla A., Carey P.D., Longley D.B., Johnston P.G. 2004. Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* V. 10. P. 2158.
- Chen P., Liu X.-Q., Lin X., Gao L.-Y., Zhang S., Huang X. 2021. Targeting YTHDF1 effectively re-sensitizes cisplatin-resistant colon cancer cells by modulating GLS-mediated glutamine metabolism. *Mol. Ther. Oncolytics.* V. 20. P. 228.
- Choi S.-U., Kim N.-Y., Choi E.-J., Kim K.-H., Lee C.-O. 1996. Establishment of doxorubicin-resistant subline derived from hct15 human colorectal cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* V. 19. P. 342.
- Cui Y., Qin L., Tian D., Wang T., Fan L., Zhang P., Wang Z. 2018. ZEB1 promotes chemoresistance to cisplatin in ovarian cancer cells by suppressing SLC3A2. *Chemotherapy.* V. 63. P. 262.
- Dasari S., Tchounwou P.B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* V. 0. P. 364.
- Dilruba S., Kalayda G.V. 2016. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* V. 77. P. 1103.
- Durinkova E., Kozovska Z., Poturnajova M., Plava J., Cierna Z., Babelova A., Bohovic R., Schmidtova S., Tomas M., Kucerovala L., Matuskova M. 2018. ALDH1A3 upregulation and spontaneous metastasis formation is associated with acquired chemoresistance in colorectal cancer cells. *BMC Cancer.* V. 18. P. 848.
- Fanciulli M., Bruno T., Giovannelli A., Gentile F.P., Di Padova M., Rubiu O., Floridi A. 2000. Energy metabolism of human LoVo colon carcinoma cells: correlation to drug resistance and influence of lonidamine. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* V. 6. P. 1590.
- Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M., Kroemer G. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* V. 31. P. 1869.
- Gupta R.S., Murray W., Gupta R. 1988. Cross resistance pattern towards anticancer drugs of a human carcinoma multidrug-resistant cell line. *Br. J. Cancer.* V. 58. P. 441.
- Harker W.G., Slade D.L., Dalton W.S., Meltzer P.S., Trent J.M. 1989. Multidrug resistance in mitoxantrone-selected HL-60 leukemia cells in the absence of P-glycoprotein overexpression. *Cancer Res.* V. 49. P. 4542.
- Huang H.-K., Lin Y.-H., Chang H.-A., Lai Y.-S., Chen Y.-C., Huang S.-C., Chou C.-Y., Chiu W.-T. 2020. Chemoresistant ovarian cancer enhances its migration abilities by increasing store-operated Ca^{2+} entry-mediated turnover of focal adhesions. *J. Biomed. Sci.* V. 27. P. 36.
- Liu Z., Qiu M., Tang Q.-L., Liu M., Lang N., Bi F. 2010. Establishment and biological characteristics of oxaliplatin-resistant human colon cancer cell lines. *Chin. J. Cancer.* V. 29. P. 661.
- Michalak M., Lach M.S., Antoszczak M., Huczyński A., Suchorska W.M. 2020. Overcoming resistance to platinum-based drugs in ovarian cancer by salinomycin and its derivatives—an in vitro study. *Molecules.* V. 25. P. 537.
- Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. 2012. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* V. 9. P. 671.
- Tang H., Liu Y.-J., Liu M., Li X. 2007. Establishment and gene analysis of an oxaliplatin-resistant colon cancer cell line THC8307/L-OHP. *Anticancer. Drugs.* V. 18. P. 633.
- Vrie W., Heyden S.V.D., Gheuens E., Bijma A., Bruijn E., Marquet R., Oosterom A., Eggermont A. 1993. Drug resistance in rat colon cancer cell lines is associated with minor changes in susceptibility to cytotoxic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* V. 37. P. 337.
- Wu Z.-X., Yang Y., Zeng L., Patel H., Bo L., Lin L., Chen Z.-S. 2021. Establishment and characterization of an irinotecan-resistant human colon cancer cell line. *Front. Oncol.* V. 10. P. 624954.
- Yang L.Y., Trujillo J.M. 1990. Biological characterization of multidrug-resistant human colon carcinoma sublines induced/selected by two methods. *Cancer Res.* V. 50. P. 3218.
- Zhang G., Fang L., Zhu L., Zhong Y., Wang P.G., Sun D. 2006. Syntheses and biological activities of 3'-azido disaccharide analogues of daunorubicin against drug-resistant leukemia. *J. Med. Chem.* V. 49. P. 1792.

The Establishment and Characterization of the Cisplatin-Resistant Human Colon Cancer Cell Line

A. V. Morshneva^{a, *}, O. O. Gnedina^a, D. N. Kindt^a, and M. V. Igotti^a

^a*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: 1195alisa@gmail.com*

To analyze the tumor recurrence mechanisms and the drug resistance it is important to generate model lines of tumor cells that are resistant to the drug of interest. This paper describes the establishment of the cisplatin-resistant colon cancer cell line HCT116 and characterizes some parameters of resistant cells, including the assessment of its proliferative, metabolic and migration activity. The research results show that the line HCT116/C obtained has more than 30-fold resistance to cisplatin compared to the original cells. Thus, as a result of our work, an *in vitro* model of resistance to cisplatin in colorectal cancer cells was created, which opens up opportunities for future research on overcoming drug resistance *in vitro* and searching for new approaches to anticancer therapy *in vivo*.

Keywords: oncology, colon cancer, chemoresistance, tumor recurrence, drug-resistant cells, cisplatin