

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИТОСТАТИКАМ НА ПРИМЕРЕ КУЛЬТУР НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО *IN VITRO*

К.А. Макавеева\*, Е.Г. Киркина, Д.С. Гайдай

АО «НПО «Дом фармации»  
188663, Российская Федерация, Ленинградская обл., Всеволожский р-н,  
г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, 3, корп. 245

Химиорезистентность является главным ограничивающим фактором применения противоопухолевых препаратов в лечении немелкоклеточного рака лёгкого. Данные по чувствительности опухолевых клеток *in vitro* к назначаемым цитостатическим препаратам могут позволить спрогнозировать химиорезистентность клеток и выбрать оптимальные лекарственные средства, нацеленные на регрессию заболевания и снижение опухолевого роста. Принимая во внимание тот факт, что методы оценки чувствительности клеток зависят от их метаболической активности, мы провели предварительный эксперимент для оценки пролиферативной активности клеток, что позволило подобрать концентрацию клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста и провести калибровку метода для клеточных культур.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак лёгкого, клеточные линии, чувствительность, химиорезистентность, *in vitro*

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Макавеева К.А., Киркина Е.Г., Гайдай Д.С. Определение чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам на примере культур немелкоклеточного рака лёгкого *in vitro*. *Биомедицина*. 2024;20(4):27–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-27-36>

Поступила 18.01.2024

Принята после доработки 13.05.2024

Опубликована 10.12.2024

## DETERMINATION OF TUMOR CELL SENSITIVITY TO CYTOSTATIC AGENTS ON THE EXAMPLE OF CULTURES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER *IN VITRO*

Kseniya A. Makaveeva\*, Ekaterina G. Kirkina, Dmitriy S. Gaidai

Scientific and Production Association «Home of Pharmacy»  
188663, Russian Federation, Leningrad Region, Vsevolozhsk District,  
Kuzmolovsky Village, Zavodskaya Str., 3, building 245

Chemoresistance is a key factor restricting the use of anticancer drugs in the treatment of non-small cell lung cancer. Data on the sensitivity of tumor cells *in vitro* to prescribed cytostatic drugs can facilitate the prediction of cell chemoresistance for selecting optimal drugs aimed at curbing the disease and suppressing tumor growth. It is known that methods for assessing the sensitivity of cells depend on their metabolic activity. In view of this, we conducted a preliminary experiment to assess the proliferative activity of cells, which allowed us to select the concentration of cells in the exponential growth phase and calibrate the method for cell cultures.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, cell lines, sensitivity, chemoresistance, *in vitro*

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Makaveeva K.A., Kirkina E.G., Gaidai D.S. Determination of Tumor Cell Sensitivity to Cytostatic Agents on the Example of Cultures of Non-Small Cell Lung Cancer *in vitro*. *Journal Biomed.* 2024;20(4):27–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-27-36>

Submitted 18.01.2024

Revised 13.05.2024

Published 10.12.2024

## Введение

Применение лекарственных препаратов в лечении немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) имеет ограничения, связанные с приобретением клетками опухоли лекарственной устойчивости, проявляющейся прогрессией или рецидивом заболевания [3]. Феномен химиорезистентности является важнейшим ограничением системной химиотерапии рака лёгкого и обусловлен высоким уровнем экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости, которые определяют около 75–85% случаев низкой эффективности химиотерапии [1].

В связи с этим крайне важно тестировать препараты с использованием методов *in vitro* на выявление химиорезистентности/чувствительности клеток к ним путём проведения скрининга их метаболической или пролиферативной активности для более релевантного выбора схемы лечения в дальнейшем.

Актуальность исследования скрининга активности цитостатических препаратов состоит в предварительном анализе пролиферативного потенциала клеток и калибровке используемого метода измерения цитотоксичности для каждой клеточной линии. Конвертация показателей, полученных с помощью основных методов измерения цитотоксичности (например, МТТ-теста, резазурина-теста, ЛДГ-теста), сильно зависит от метаболической активности клеток. Научной новизной исследования является использование подхода, учитывающего индивидуальные способности клеток, заключающиеся в их пролиферативной активности.

В проведённом исследовании была изучена чувствительность клеток к воздействию

препаратов с помощью МТТ-теста, с предварительной оценкой пролиферативной активности клеток НМРЛ для нахождения экспоненциальной фазы роста клеток, где был также определён линейный диапазон с максимумом поглощения длины волны, свидетельствующий о максимальной метаболической активности клеток. Изучение пролиферативной активности клеток позволяет учитывать особенности роста клеток, используемых в качестве тест-системы *in vitro* для скрининга противоопухолевых препаратов, и может способствовать более точному измерению плотности клеток для определения их чувствительности к препаратам.

Данное исследование носит практический характер, предполагает апробацию подхода к определению чувствительности клеток, заключающегося в предварительной оценке пролиферативной активности клеток, подбора их оптимальной плотности и проведения калибровки метода измерения.

**Цель работы** — апробация подхода к определению чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам на примере культур немелкоклеточного рака лёгкого *in vitro* с предварительной оценкой их пролиферативной активности.

## Материалы и методы

Резистентность опухолевых клеток может быть спрогнозирована с помощью методов измерения цитотоксичности, позволяющих оценить степень токсического воздействия лекарственного средства на пролиферацию клеток и их жизнеспособность на основа-

нии получения полумаксимальных эффективных концентраций ( $IC_{50}$ ), вызывающих 50% ингибирование клеточной пролиферации. Чувствительными к воздействию препарата считаются клетки, большинство из которых теряют свои пролиферативные свойства и нежизнеспособны, тогда как резистентными считаются клетки, которые сохраняют жизнеспособность в присутствии лекарственного средства [2].

В данном исследовании использовали колориметрический анализ с помощью МТТ-теста, который позволяет оценивать интенсивность пролиферации на показатель метаболической активности клеток.

В основе теста лежит реакция превращения бледно-жёлтого красителя — 3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5 дифенилтетразолия бромида (МТТ) — в формазан фиолетового цвета под действием фермента сукцинатдегидрогеназы [4].

По результатам МТТ-теста вычисляли значения полумаксимальных эффективных концентраций ( $IC_{50}$ ).

#### **Исследуемый объект**

Объектом исследования являлся лекарственный препарат Цисплатин-Тева (МНН: Цисплатин, «Teva Pharmaceutical Industries Ltd.», Нидерланды) в виде р-ра с концентрацией 0,5 мг/мл, Этопозид-Тева (МНН: Этопозид, «Teva Pharmaceutical Industries Ltd.», Нидерланды) в виде р-ра с концентрацией 20 мг/мл, Паклитаксел-Тева (МНН: Паклитаксел, «Teva Pharmaceutical Industries Ltd.», Нидерланды) в виде р-ра с концентрацией 6 мг/мл.

В качестве вещества позитивного контроля использовали 10% р-р додецилсульфата натрия. Выбор вещества позитивного контроля обусловлен известными цитотоксическими свойствами, которые реализуются за счёт лизиса клеток монослоя путём реализации неселективного механизма действия катионных поверхностно-активных веществ.

Также использовали отрицательный контроль, представляющий собой носитель,

питательную среду DMEM, с содержанием 10% FBS и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина.

#### **Клеточные линии**

В эксперименте использовали клеточные линии немелкоклеточного рака лёгкого, полученные от разных доноров, различающиеся по типу гистологических форм НМРЛ. Клеточная линия A549 (ООО «Биолот», Россия) выделена из аденокарциномы лёгкого и охарактеризована как репрезентативная клеточная линия для пневмоцитов альвеолярного II типа лёгких человека. Клеточная линия NCI-H1975 выделена из аденокарциномы лёгких («АТСС», Американская коллекция типовых клеточных культур). Клеточная линия NCI-H1299 выделена из метастазов в лимфатическом узле и представлена как многоклеточный подтип карциномы («АТСС», Американская коллекция типовых клеточных культур). Клеточная линия NCI-H460 выделена из плеврального выпота и по типу гистологической формы является крупноклеточным раком лёгкого («АТСС», Американская коллекция типовых клеточных культур).

Клеточные линии культивировали согласно стандартным условиям культивирования в полной среде DMEM в  $CO_2$ -инкубаторе в условиях 5%  $CO_2$  и 37°C.

#### **МТТ-тест**

##### **Оценка пролиферативной активности клеток**

Для проведения эксперимента каждую клеточную линию рассевали в лунки 96-луночного планшета в количестве 100, 80, 60, 40, 20 и 10% монослоя и холостой пробы. 100% монослой получали в результате произведения количества диссоциированных и жизнеспособных клеток/см<sup>2</sup> культурального 75-см<sup>2</sup> флакона и площади лунки 96-луночного планшета, составляющей 0,32 см<sup>2</sup>. 80%–10% монослой клеток готовили как разведения, представляющие собой 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 и 0,1 объёма от изначально-го объёма суспензии.

Клетки высевали в культуральные 96-луночные плоскодонные планшеты (для каждой клеточной культуры — один планшет) путём внесения 100 мкл полученной суспензии.

Пролиферативную активность клеток оценивали через 4, 24, 48 и 72 ч после посева на лунки планшета в каждой концентрации клеток.

По истечении инкубации клеток из лунок удаляли супернатант и вносили 100 мкл р-ра МТТ, приготовленного в полной среде с концентрацией 0,5 мг/мл. По завершении инкубации с красителем, через 2 ч, вносили по 100 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Измерение проводили с помощью микропланшетного спектрофотометра xMARK («Bio-Rad», США) при длине волны поглощения 450 нм за вычетом фонового поглощения при 650 нм. После полученных результатов с учётом вычета холостой пробы был вычислен процент ингибирования по следующей формуле (2):

$$I_{\text{инг}} = \frac{OD_{\text{отрк}} - OD_{\text{эксп}}}{OD_{\text{отрк}}} \times 100\% \quad (2),$$

где  $I_{\text{инг}}$  — индекс ингибирования;  $OD_{\text{отрк}}$  — значение оптической плотности отрицательного контроля;  $OD_{\text{эксп}}$  — значение оптической плотности в экспериментальной лунке.

Значения  $IC_{50}$  рассчитывали с помощью лицензионного программного обеспечения Prism 9.1.1 («GraphPad Software», США), с построением кривой, соответствующей сигмоидальной модели доза-реакция.

### Статистический анализ

Для всех данных применялась описательная статистика: данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро—Уилка. Межгрупповые различия анализировали параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим межгрупповым сравнением с использованием критерия Даннета.

Различия определяли при уровне значимости  $p < 0,05$ . Статистический анализ выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения Prism 9.1.1 («GraphPad Software», США).

$$ЖК(\%) = \frac{OD_{\text{эксп}} - OD_{\text{хп}}}{OD_{\text{пол.к}} - OD_{\text{хп}}} \times 100\% \quad (1),$$

где ЖК — процент жизнеспособных клеток;  $OD_{\text{эксп}}$  — оптическая плотность в экспериментальной лунке планшета;  $OD_{\text{хп}}$  — оптическая плотность в лунке холостой пробы, где концентрация клеток 0%;  $OD_{\text{пол.к}}$  — оптическая плотность в лунке положительно-го контроля, где концентрация клеток 100%.

### Определение чувствительности клеток к препаратам

Для проведения эксперимента каждую клеточную линию рассевали в лунки 96-луночного планшета в количестве клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста: А549 — 11,5 тыс. кл./лунку, NCI-H1975 — 10,8 тыс. кл./лунку, NCI-H1299 — 28,2 тыс. кл./лунку, NCI-H460 — 23,0 тыс. кл./лунку в объёме 100 мкл полной среды. По истечении 24 ч вносили разведения тестируемых объектов в концентрациях 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 0,1 мкМ, 0,01 мкМ и 0,001 мкМ. Время инкубации клеток с препаратами составляло 24 ч и было обусловлено временем периода по-

## Результаты исследований

### Оценка пролиферативной активности клеток

Для всех клеточных линий в лунках, представляющих собой процент клеточного монослоя выше 0 (от 10 до 100%), была выявлена активность ферментативных систем сукцинатдегидрогеназы, что свидетельствует в первую очередь об их жизнеспособности. Оптическая плотность находилась в прямой зависимости от количества клеток в лунке планшета.

На рисунке у всех клеточных линий при 48-часовой инкубации оптическая плотность клеток в концентрациях 10–80% имела статистически достоверные различия от значений при 100%. Клеточная линия

NCI-H1299 (А) при 24-часовой инкубации в диапазоне концентраций 10–80% показала статистически значимые отличия от концентрации 100% (табл. 1). При 24-часовой инкубации у клеточной линии NCI-H460 (Б) в диапазоне концентраций 10–60% были обнаружены статистически значимые отличия от концентрации 100% (табл. 2). При 24-часовой инкубации у клеточной линии NCI-H1975 (В) в диапазоне концентраций 10–80% обнаружены статистически значимые отличия от концентрации 100% (табл. 3). У клеточной линии A549 (Г) при 24-часовой инкубации в диапазоне концентраций 10–60% обнаружены статистически значимые отличия от концентрации 100% (табл. 4).

**Таблица 1.** Зависимость оптической плотности содержимого лунок клеточной линии NCI-H1299 от времени инкубации и концентрации клеток в лунке планшета,  $M [SD]$ ,  $n=6$

**Table 1.** Dependence between the optical density of the well contents of the NCI-H1299 cell line and the incubation time and concentration of cells in a well,  $M [SD]$ ,  $n=6$

Концентрация		M±SD	Время инкубации			
% монослоя	Количество клеток в лунке		4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
100	35200	M	0,31 <sup>ab</sup>	0,31 <sup>ab</sup>	0,61 <sup>b</sup>	0,62 <sup>a</sup>
		SD	0,02	0,02	0,03	0,03
80	28160	M	0,19 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	0,46 <sup>ab</sup>	0,59 <sup>a</sup>
		SD	0,02	0,02	0,01	0,09
60	21120	M	0,16 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>ab</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	0,52 <sup>ab</sup>
		SD	0,01	0,01	0,02	0,04
40	14080	M	0,12 <sup>ab</sup>	0,12 <sup>ab</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,50 <sup>ab</sup>
		SD	0,01	0,01	0,02	0,04
20	7040	M	0,07 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	0,38 <sup>ab</sup>
		SD	0,01	0,01	0,02	0,02
10	3520	M	0,04 <sup>ab</sup>	0,04 <sup>ab</sup>	0,15 <sup>ab</sup>	0,26 <sup>ab</sup>
		SD	0,02	0,02	0,01	0,01
0	0	M	-2,3×10 <sup>-6b</sup>	-2,3×10 <sup>-6b</sup>	-2,3×10 <sup>-6b</sup>	-1,8×10 <sup>-6b</sup>
		SD	0,01	0,01	0,01	0,00

**Примечания (здесь и далее):** <sup>a</sup> — ANOVA, *post-hoc* критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с отрицательным контролем (холостая проба) при  $p<0,05$ ; <sup>b</sup> — ANOVA, *post-hoc* критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с положительным контролем (100% клеточного монослоя) при  $p<0,05$ .

**Notes (hereinafter):** <sup>a</sup> — ANOVA, Dunnett's *post-hoc* test, differences are statistically significant compared to the negative control (blank sample) at  $p<0.05$ ; <sup>b</sup> — ANOVA, Dunnett's *post-hoc* test, differences are statistically significant compared to the positive control (100% cell monolayer) at  $p<0.05$ .

**Таблица 2.** Зависимость оптической плотности содержимого лунок клеточной линии NCI-H460 от времени инкубации и концентрации клеток в лунке планшета,  $M [SD]$ ,  $n=6$   
**Table 2.** Dependence between the optical density of the well contents of the NCI-H460 cell line and the incubation time and concentration of cells in a well,  $M [SD]$ ,  $n=6$

Концентрация		M±SD	Время инкубации			
% монослоя	Количество клеток в лунке		4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
100	38400	M	0,30 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,31 <sup>a</sup>
		SD	0,03	0,019	0,02	0,13
80	30720	M	0,25 <sup>a</sup>	0,31 <sup>ab</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,41 <sup>a</sup>
		SD	0,04	0,02	0,02	0,07
60	23040	M	0,20 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,34 <sup>ab</sup>	0,44 <sup>a</sup>
		SD	0,04	0,01	0,05	0,05
40	15360	M	0,15 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>ab</sup>	0,32 <sup>ab</sup>	0,38 <sup>a</sup>
		SD	0,03	0,02	0,04	0,15
20	7680	M	0,08 <sup>ab</sup>	0,11 <sup>ab</sup>	0,24 <sup>ab</sup>	0,35 <sup>a</sup>
		SD	0,03	0,01	0,01	0,09
10	3840	M	0,05 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>ab</sup>	0,2982 <sup>a</sup>
		SD	0,01	0,00	0,02	0,06
Холодная проба	0	M	1,3×10 <sup>-6b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
		SD	0,01	0,00	0,01	0,02

**Таблица 3.** Зависимость оптической плотности содержимого лунок клеточной линии NCI-H1975 от времени инкубации и концентрации клеток в лунке планшета,  $M [SD]$ ,  $n=6$   
**Table 3.** Dependence between the optical density of the well contents of the NCI-H1975 cell line and the incubation time and cell concentration in a well,  $M [SD]$ ,  $n=6$

Концентрация		M±SD	Время инкубации			
% монослоя	Количество клеток в лунке		4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
100	18000	M	0,13 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>
		SD	0,02	0,02	0,04	0,02
80	14400	M	0,10 <sup>ab</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>
		SD	0,01	0,02	0,04	0,02
60	10800	M	0,08 <sup>ab</sup>	0,10 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>
		SD	0,01	0,01	0,01	0,02
40	7200	M	0,04 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>ab</sup>	0,09 <sup>ab</sup>	0,08 <sup>ab</sup>
		SD	0,01	0,02	0,02	0,01
20	3600	M	0,02 <sup>b</sup>	0,03 <sup>ab</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,06 <sup>ab</sup>
		SD	0,01	0,01	0,02	0,02
10	1800	M	0,01 <sup>b</sup>	0,02	0,02 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>
		SD	0,01	0,01 <sup>b</sup>	0,01	0,01
0	0	M	1,8×10 <sup>-6b</sup>	2,3×10 <sup>-6b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	-2,3×10 <sup>-6b</sup>
		SD	0,00	0,01	0,01	0,01

**Таблица 4.** Зависимость оптической плотности содержимого лунок клеточной линии A549 от времени инкубации и концентрации клеток в лунке планшета, M [SD], n=6

**Table 4.** Dependence between the optical density of the well contents of the A549 cell line and the incubation time and cell concentration in a well, M [SD], n=6

Концентрация		M±SD	Время инкубации			
% монослоя	Количество клеток в лунке		4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
100	19200	M	0,29 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>
		SD	0,01	0,05	0,01	0,09
80	15200	M	0,26 <sup>ab</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,41 <sup>ab</sup>	0,35 <sup>a</sup>
		SD	0,03	0,03	0,11	0,02
60	11500	M	0,22 <sup>ab</sup>	0,54 <sup>ab</sup>	0,33 <sup>ab</sup>	0,32 <sup>a</sup>
		SD	0,02	0,04	0,03	0,02
40	7600	M	0,16 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>ab</sup>
		SD	0,03	0,03	0,02	0,08
20	3840	M	0,09 <sup>ab</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>ab</sup>	0,21 <sup>ab</sup>
		SD	0,02	0,02	0,02	0,08
10	1920	M	0,04 <sup>ab</sup>	0,12 <sup>ab</sup>	0,11 <sup>ab</sup>	0,17 <sup>ab</sup>
		SD	0,02 <sup>ab</sup>	0,03	0,01	0,01
0	0	M	1,3×10 <sup>-6b</sup>	2,3×10 <sup>-6b</sup>	-2,8×10 <sup>-6b</sup>	0,00
		SD	0,01	0,01	0,02	0,00

### Определение чувствительности клеток к препаратам

Согласно полученным значениям IC<sub>50</sub>, к цисплатину оказались чувствительны клетки аденокарциномы, NCI-H1975 и A549, причём из них обнаруживает наибольшую чувствительность клеточная линия NCI-H1975 (2,6 мкМ). Наименьшую чувствительность выявили у клеток крупноклеточного рака лёгкого, NCI-H460 и NCI-H1299, где NCI-H1299 обладает самым высоким значением полумаксимальной ингибирующей концентрации (118 мкМ), что свидетельствует о наибольшей резистентности.

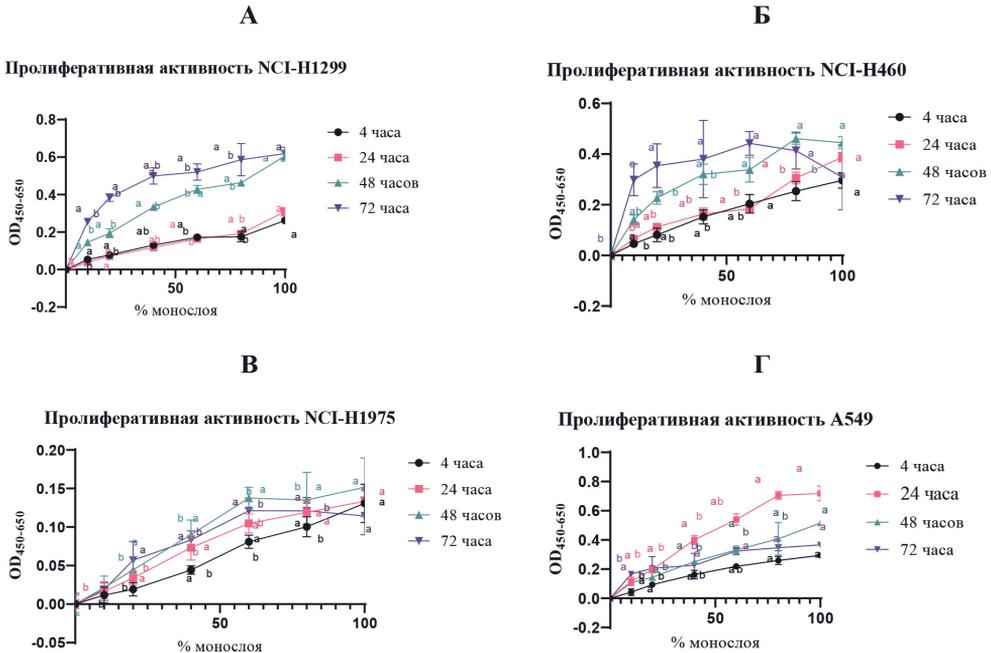
К этопозиду значения полумаксимальных ингибирующих концентраций оказались самыми высокими, что свидетельствует о меньшей чувствительности клеток к этому препарату, при этом клеточные линии аденокарциномы проявляют большую чувствительность к препарату, чем клетки крупноклеточного рака лёгкого, среди которых наиболее резистентными оказались клетки NCI-H460 (715 мкМ).

К паклитакселу клетки обнаруживают наибольшую чувствительность, у всех клеточных линий значения полумаксимальных эффективных концентраций яв-

**Таблица 5.** Значения IC<sub>50</sub> известных цитостатических препаратов на клеточных линиях НМРЛ

**Table 5.** IC<sub>50</sub> values of known cytostatic drugs on NSCLC cell lines

Препарат	Клеточные линии			
	NCI-H1299	NCI-H460	NCI-H1975	A549
IC <sub>50</sub> (мкМ)				
Цисплатин	118	57	2,6	27
Этопозид	269	715	100	98
Паклитаксел	14,3	32	0,7	17



**Рис.** Результаты оценки пролиферативной активности клеток NCI-H1299 (А), NCI-H 460 (Б), NCI-H1975 (В), A549 (Г). Представлены  $OD_{450-650}$  жизнеспособных клеток ( $M \pm SD$ ,  $n=6$ ).

**Fig.** Proliferative activity of NCI-H1299 (A), NCI-H 460 (Б), NCI-H1975 (В), and A549 (Г) cells.  $OD_{450-650}$  of viable cells are presented ( $M \pm SD$ ,  $n=6$ ).

**Примечание:** а — ANOVA, post-hoc критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с отрицательным контролем (0% клеток) при  $p < 0,05$ ; б — ANOVA, post-hoc критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с положительным контролем (100% клетки) при  $p < 0,05$ .

**Note:** а — ANOVA, Dunnett's post-hoc test, differences are statistically significant compared to the negative control (0% of cells) at  $p < 0.05$ ; б — ANOVA, Dunnett's post-hoc test, differences are statistically significant compared to the positive control (100% of cells) at  $p < 0.05$ .

ляются низкими по сравнению со значениями, полученными для других препаратов. Наибольшую чувствительность по сравнению с другими клеточными линиями проявляет NCI-H1975 (0,7 мкМ). Меньшая чувствительность была выявлена у A549 (17 мкМ) и NCI-H1299 (14,3 мкМ), тогда как NCI-H460 обладало самым большим значением полумаксимальной эффективной концентрации (32 мкМ), что может говорить о наименьшей чувствительности к препарату. Результаты представлены в табл. 5.

## Обсуждение результатов

### Оценка пролиферативной активности клеток

Выбор оптимальной клеточной концентрации был обусловлен наличием максимальной пролиферативной активности клеток в лог-фазе роста культуры, но не доходящей до стадии плато, при наличии статистически значимых отличий относительно значений положительного контроля (100% клеточного моноослоя, характерного для стадии плато) и холостой пробы (0% клеточного моноослоя).

Для клеток линии NCI-H1299 выбрали 80% клеточного монослоя или 28160 клеток на лунку при 24-часовой инкубации. У клеточной линии NCI-H460 выбрали 60% клеточного монослоя или 23040 клеток на лунку при 24-часовой инкубации. Концентрация клеток линии NCI-H1975 составила 60% клеточного монослоя или 10800 клеток на лунку при 24-часовой инкубации. Концентрация клеток линии A549 составила 60% клеточного монослоя или 11500 клеток на лунку при 24-часовой инкубации.

### Определение чувствительности клеток к препаратам

По полученным значениям  $IC_{50}$  можно заключить, что наиболее чувствительными к препаратам являются клеточные линии аденокарциномы немелкоклеточного рака лёгкого (NCI-H1975 и A549), тогда как крупноклеточный рак лёгкого проявляет резистентность ко всем препаратам (NCI-H460), однако клетки NCI-H1299 оказались чувствительны к воздействию паклитаксела. Согласно проведённому исследованию, паклитаксел оказывал цитотоксическое действие в концентрациях 1 мМ, 100 мкМ на все клеточные линии,

на NCI-H1975 также в концентрациях 10 мкМ и 1 мкМ. Этопозид, как и цисплатин, оказывал цитотоксическое действие только при 1000 мкМ на все клеточные линии. Однако в концентрации 100 мкМ цисплатин оказывал цитостатическое действие на все клеточные линии, тогда как этопозид — только на клетки аденокарциномы, что подтверждает то, что к паклитакселу клетки оказались наиболее чувствительны, тогда как к этопозиду — резистентны.

### Заключение

Проведённое исследование позволило подобрать оптимальную концентрацию клеток НМРЛ *in vitro* и учесть их индивидуальные особенности для определения чувствительности к цитостатикам. Разные клеточные линии НМРЛ имеют такие индивидуальные характеристики, как плотность посева на лунку, морфологические особенности, скорость удвоения популяции и время выхода на лог-фазу роста.

Полученные результаты подтверждают успешную апробацию данного подхода к определению химиорезистентности клеток на примере тестирования известных препаратов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Боярских У.А., Кондрахин Ю.В., Евшин И.С., Шарипов Р.Н., Комельков А.В., Мусаткина Е.А., Чевкина Е.М., Сукоян М.А., Колпаков Ф.А., Кашкин К.Н., Филипенко М.Л. Прогнозирование чувствительности клеток немелкоклеточного рака лёгких к действию цисплатина и паклитаксела на основании уровня экспрессии маркерных генов. *Молекулярная биология*. 2011;45(4):652–661. [Boyarских U.A., Kondrakhin Yu.V., Evshin I.S., Sharipov R.N., Komelkov A.V., Musatkina E.A., Chevkina E.M., Sukoyan M.A., Kolpakov F.A., Kashkin K.N., Filipenko M.L. Prognostirovanie chuvstvitel'nosti kletok nemelkokletochnogo raka legkikh k deystviyu tsisplatina i paklitakselu na osnovanii urovnya ekspressii markernykh genov [Prediction of the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to the action of cisplatin and paclitaxel based on the level of expression of marker genes]. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular Biology]. 2011;45(4):652–661. (In Russian)].
2. Кузин К.А., Фетисов Т.И., Князев Р.И., Фомина Л.Я., Мехеда Л.В., Лесовая Е.А., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г., Кирсанов К.И. Определение химиорезистентности клеток рака яичников *in vitro*. *Успехи молекулярной онкологии*. 2019;6(4):8–25. [Fomina L.Ya., Mekheda L.V., Lesovaya E.A., Belitsky G.A., Yakubovskaya M.G., Kirsanov K.I. Opredelenie khimiorезистентности kletok raka yaichnikov *in vitro* [Determination of chemoresistance of ovarian cancer cells *in vitro*] *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* [Advances in Molecular Oncology]. 2019;6(4):8–25. (In Russian)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-8-25
3. Миллер С., Родионов Е., Тузиков С., Ефтеев Л.А., Юмов Е.Л., Цыганов М.М., Литвяков Н.В., Фролова И.Г., Чердынцева Н.В., Величко С.А., Гольдберг А.В. Комбинированное лечение местнораспространённого немелкоклеточного рака лёгкого и молекулярные аспекты химиорезистентности. *Вопросы онкологии*. 2019;65(3):393–398. [Miller S.,

Rodionov E., Tuzikov S., Efteev L.A., Yumov E.L., Tsyganov M.M., Litvyakov N.V., Frolova I.G., Cherdyntseva N.V., Velichko S.A., Goldberg A.V. Kombinirovannoe lechenie mestnorasprostrannogo nemelkokletchnogo raka legkogo i molekulyarnye aspekty khimiorезистентности [Combined treatment of locally advanced non-small cell lung cancer and molecular as-

pects of chemoresistance]. *Voprosy onkologii [Problems in Oncology]*. 2019;65(3):393–398. (In Russian). DOI: 10.37469/0507-3758-2019-65-3-393-398

4. Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S., Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods Mol. Biol.* 2017;1601:1–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9\_1

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Макавецкая Ксения Александровна\***, АО «НПО «Дом фармации»;  
**e-mail: [makaveeva.ka@doclinika.ru](mailto:makaveeva.ka@doclinika.ru)**

**Kseniya A. Makaveeva\***, Scientific and Production Association «Home of Pharmacy»;  
**e-mail: [makaveeva.ka@doclinika.ru](mailto:makaveeva.ka@doclinika.ru)**

**Киркина Екатерина Геннадьевна**, АО «НПО «Дом фармации»;  
**e-mail: [kirkina.eg@doclinika.ru](mailto:kirkina.eg@doclinika.ru)**

**Ekaterina G. Kirkina**, Scientific and Production Association «Home of Pharmacy»;  
**e-mail: [kirkina.eg@doclinika.ru](mailto:kirkina.eg@doclinika.ru)**

**Гайдай Дмитрий Сергеевич**, АО «НПО «Дом фармации»;  
**e-mail: [gajdaj.ds@doclinika.ru](mailto:gajdaj.ds@doclinika.ru)**

**Dmitriy S. Gaidai**, Scientific and Production Association «Home of Pharmacy»;  
**e-mail: [gajdaj.ds@doclinika.ru](mailto:gajdaj.ds@doclinika.ru)**

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author