

ЭФФЕКТЫ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ДИМЕРНЫХ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ MCF-7

© 2020 г. К.А. Чурюкина*, А.Л. Жузе**, А.А. Иванов**, И.А. Замулаева*

*Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии МЗ РФ, 249036, Обнинск Калужской области, ул. Королева, 4

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: churiukina@inbox.ru

Поступила в редакцию 16.08.2019 г.

После доработки 25.11.2019 г.

Принята к публикации 29.11.2019 г.

Работа посвящена поиску способов элиминации и/или повышения радиочувствительности популяции опухолевых стволовых клеток, составляющих радиорезистентную часть злокачественных новообразований. Исследованы эффекты раздельного и комбинированного действия γ -излучения в дозе 4 Гр и димерных бисбензимидазолов серии DB(n) с количеством групп в метиленовом линкере, соединяющем два бисбензимидазола (n), равном 5 или 7, на опухолевые стволовые клетки линии MCF-7 рака молочной железы человека. Показано, что бисбензимидазол DB(5) значительно снижает относительное и абсолютное количество опухолевых стволовых клеток в 5.8 и 7.5 раза соответственно по сравнению с контролем ($p = 0,001$ в обоих случаях), а бисбензимидазол DB(7) – в 3.6 ($p = 0.003$) и 5.2 раза ($p = 0.004$) соответственно. Облучение приводит к увеличению относительного и абсолютного количества опухолевых стволовых клеток в 1.7 и 1.6 раза ($p < 0.05$) соответственно по сравнению с контролем. При комбинированном воздействии бисбензимидазолов DB(5,7) и облучения происходит значительное снижение относительного количества опухолевых стволовых клеток в 8.2 ($p = 0.003$) и 4.1 раза ($p = 0.004$) соответственно по сравнению с раздельным облучением. Еще более выраженные эффекты обнаружены в отношении абсолютного количества опухолевых стволовых клеток, которое уменьшалось при комбинированном воздействии в 16.6 и 14.1 раза соответственно по сравнению с облучением ($p = 0.006$ в обоих случаях). При комбинированном действии бисбензимидазолов DB(5,7) и облучения происходит блокирование радиационно индуцированной эпителиально-мезенхимальной трансформации по критерию экспрессии виментина – одного из основных маркеров этого процесса, играющего важную роль в формировании пула опухолевых стволовых клеток.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки, димерные бисбензимидазолы, ионизирующее излучение, комбинированное воздействие, проточная цитометрия.

DOI: 10.31857/S0006302920010111

Лучевая терапия широко применяется в клинике в качестве одного из основных методов лечения злокачественных новообразований. Несмотря на постоянное совершенствование существующих и внедрение новых методов лучевой терапии (адронная, бинарная, тканевая, фотодинамическая терапия и др.), остается нерешенной проблема возникновения рецидивов и метастазов у части пролеченных больных с полной клинической регрессией первичного очага. Многочис-

ленные механизмы радиорезистентности опухолевых клеток, которые могут обеспечить выживание части из них как источника рецидивирования опухолевого процесса после лучевой терапии, изучаются уже не один десяток лет и с разных позиций, но в последние годы внимание специалистов в области радиационной онкологии привлечено к концепции о существовании опухолевых стволовых клеток (ОСК) [1, 2]. Показано, что ОСК, обнаруженные *in vitro* в стабильных и первичных культурах опухолевых клеток, а также *in vivo* в большинстве злокачественных новообразований экспериментальных животных и человека, обладают способностью к самообновлению и дифференцировке в гетерогенные линии клеток,

Сокращения: ОСК – опухолевые стволовые клетки, DB(n) – димерные бисбензимидазолы (dimeric bisbenzimidazoles, n – число метильных групп в линкере), ЭМТ – эпителиально-мезенхимальная трансформация, ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцитат, ФЭ – фикоэритрин.



Рис. 1. Химическая формула димерных бисбензимидазолов $DB(n)$, где $n = 1-11$.

которые составляют опухоль (в отличие от нестволовых клеток). Кроме того, результаты собственных исследований и данные литературы доказывают, что ОСК являются более радио- и химиорезистентными по сравнению с остальной массой опухолевых клеток [3–8].

Эти обстоятельства, во-первых, дают основание предполагать, что именно ОСК определяют неблагоприятные отдаленные результаты лучевой и комбинированной терапии и, во-вторых, обосновывают необходимость поиска средств, направленных на элиминацию ОСК и/или повышение их чувствительности к известным противоопухолевым воздействиям. В этой связи следует отметить, что в последнее время происходит стремительный рост количества публикаций, сообщающих о результатах поиска и разработки таких средств не только на стадии доклинических, но и клинических испытаний [9–11]. В основе таких исследований лежат многочисленные данные о молекулярно-клеточных особенностях и механизмах радио- и химиорезистентности ОСК, включая более высокую эффективность репарации радиационных повреждений ДНК (например, за счет активации чекпоинт-киназ СНК1 и СНК2), высокую активность антиоксидантной системы (например, вследствие повышенной экспрессии белков, участвующих в утилизации свободных радикалов), быстрое выведение во внеклеточную среду многих цитотоксических препаратов из ОСК (в результате гиперэкспрессии АТФ-зависимых белковых транспортеров на клеточной мембране) по сравнению с остальными (нестволовыми) клетками и т. д. [4, 12–15]. Формирование резистентности ОСК на уровне организма – еще более сложный процесс, поскольку включает влияние множества сигнальных молекул (например, TGF- β 1, FGF, IL-6, HIF, Wnt-лиганды и так далее), секретируемых не только опухолевыми, но и различными стромальными клетками, и таких факторов, как концентрация кислорода и рН внеклеточной среды, влияющих на радиочувствительность [16, 17]. Соответственно, мишенями средств элиминации ОСК

или изменения их свойств являются сигнальные пути, активные преимущественно в ОСК, включая Henghog, Notch, Stat, Wnt/ β -катенин и другие, транспортеры оттока веществ из клеток, системы репарации ДНК, и пути клеточной гибели, различные факторы микроокружения опухоли, поверхностные антигены ОСК (CD44, CD133 и др.) [12, 14, 18–21].

Недавние исследования продемонстрировали важную роль эпигенетических механизмов, таких как метилирование ДНК и модификация гистонов, в процессах дифференцировки/дифференцировки опухолевых клеток и поддержании резистентности ОСК к противоопухолевым воздействиям (в том числе к ионизирующему излучению) [22, 23]. В связи с этим соединения, способные влиять на ремоделирование хроматина и другие эпигенетические изменения, могут представлять интерес в плане поиска средств элиминации и/или повышения радиочувствительности ОСК. Российскими химиками из Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН были синтезированы оригинальные ДНК-связывающие соединения – димерные бисбензимидазолы (dimeric bisbenzimidazoles – $DB(n)$), которые содержат в своей структуре два 2,6-замещенных бензимидазола, связанных между собой олигометиленовым линкером разной длины (n – число метильных групп в линкере, может варьировать от 1 до 11) (рис. 1) [24]. Во внеклеточных модельных системах было показано, что эти соединения эффективно ингибируют ДНК-метилтрансферазу и ДНК-топоизомеразу I [25, 26]. Кроме того, некоторые бисбензимидазолы (с $n = 5$ или 7) оказались высокотоксичными для общей массы клеток рака молочной железы линии MCF-7 по критериям снижения их количества, жизнеспособности и клоногенной активности в условиях *in vitro* [27], однако влияние этих соединений на ОСК ранее не исследовалось. Поэтому целью данной работы является выяснение эффектов действия бисбензимидазолов $DB(5,7)$ на ОСК линии MCF-7 при раздельном применении и в комбинации с ионизирующим излучением. Оценива-

ли эффекты действия DB(5,7) на ОСК и остальные клетки по критериям внутриклеточного содержания этих соединений, относительного и абсолютного количества клеток, сохранивших жизнеспособность в близкие сроки после воздействия. Кроме того, в работе впервые исследовали влияние указанных соединений на эпителиально-мезенхимальную трансзицию (ЭМТ), которая, как известно, участвует в формировании пула ОСК, резистентности этих клеток к повреждающим воздействиям и усиливается под влиянием ионизирующего излучения [28–31]. В частности, показано, что при облучении в опухолевых клетках активируется транскрипция основных регуляторов ЭМТ (Snail, ZEB-1, STAT3, HIF-1 β и др.), которые, в свою очередь запускают сигнальные пути, в том числе TGF- β , WNT, p38 MAPK и другие, способствующие приобретению выжившими после облучения опухолевыми клетками фенотипа ЭМТ и ОСК [29]. Поэтому, учитывая важную роль ЭМТ в радиационном ответе опухолевых клеток эпителиального происхождения и принимая во внимание известные данные о значении метилирования ДНК для ЭМТ, мы предположили, что DB(*n*), способные ингибировать активность ДНК-метилтрансферазы, могут влиять на ЭМТ и таким образом изменять размер пула ОСК. Для проверки этого предположения была исследована экспрессия виментина (белка промежуточных филаментов цитоскелета, являющегося одним из основных маркеров ЭМТ) после раздельного или комбинированного действия DB(5,7) и ионизирующего излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 культивировали во флаконах площадью 25 см² (Corning, США) в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (Biosega, Франция), пенициллина (50000 ед/л), стрептомицина (50 мг/л) и глутамина (292 мг/л) в CO₂-инкубаторе (NuAire, США) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки рассевали два раза в неделю, снимая с подложки с помощью раствора версена и трипсина (ПанЭко, РФ).

Исследуемые химические соединения. Димерные бисбензимидазолы DB(*n*) синтезированы в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по методике, подробно описанной в работе [24]. Они представляют собой низкомолекулярные флуоресцентные соединения, нековалентно связывающиеся с А–Т-парами в узкой бороздке ДНК. Из всей линейки DB(*n*) в данной работе использовали два соединения, в

которых бисбензимидазольные блоки соединены между собой линкером с числом метильных групп (*n*), равным 5 или 7.

Инкубация с изучаемыми соединениями и облучение клеток. Через сутки после посева к клеткам добавляли DB(5) или DB(7) в конечной концентрации 20 мкмоль/л, при которой, как ранее было показано [25], происходит выраженное уменьшение общего количества опухолевых клеток. Клетки инкубировали с соединениями 24 ч в стандартных условиях и затем подвергали воздействию γ -излучения на установке «Рокус-АМ» в дозе 4 Гр (мощность дозы 1,5 Гр/мин), которая также была выбрана ранее для исследования эффектов комбинированного действия DB(*n*) на общую популяцию клеток MCF-7 [25]. Далее клетки помещали в стандартные условия культивирования в CO₂-инкубатор на двое суток.

Определение количества CD44⁺CD24^{-/low}-ОСК. Выбор маркеров для идентификации ОСК рака молочной железы в нашей работе был сделан на основе литературных данных. Как известно, рак молочной железы был первой солидной опухолью, в которой установлено наличие ОСК [32]. Авторы этого исследования идентифицировали ОСК по экспрессии CD44 при отсутствии или низкой экспрессии CD24 на поверхности этих клеток с помощью соответствующих антител. По настоящее время этот иммунофенотип (CD44⁺CD24^{-/low}) наиболее часто используется в различных исследованиях для выявления ОСК рака молочной железы, в том числе в стабильной культуре линии MCF-7. Учитывая многочисленные доказательства принадлежности CD44⁺CD24^{-/low}-клеток к популяции ОСК рака молочной железы, именно этот иммунофенотип был выбран нами для выявления ОСК.

Клетки извлекали из флаконов в холодный раствор Хэнкса и инкубировали со смесью моноклональных антител к CD44, меченных флуоресцеинизотиоцитатом (ФИТЦ) (BD Biosciences, США), и антител к CD24, меченных фикоэритрином (ФЭ) (BD Biosciences, США), из расчета по 20 мкл антител на 1 млн клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела соответствующих изотипов к гемоцианину улитки, конъюгированные с теми же флуорохромами, что и антитела к указанным поверхностным маркерам (BD Biosciences, США).

Пробы инкубировали с антителами 30 мин на льду в темноте, затем отмывали в 0,01 моль/л фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, pH 7.2) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage (BD Biosciences, США). Для измерения флуоресценции ФИТЦ использовали узкопо-

лосные фильтры 530/30 нм, для ФЭ — 585/42 нм. Полученные данные об интенсивности прямого и бокового светорассеяния, флуоресценции ФИТЦ и ФЭ записывали в файл, который обрабатывали с помощью программы CellQuestPro (BD Biosciences, США). Определяли относительное количество ОСК (в %) с иммунофенотипом $CD44^+CD24^{-/low}$ среди неповрежденных клеток, выделенных по параметрам прямого и бокового светорассеяния по общепринятой методике. Абсолютное количество $CD44^+CD24^{-/low}$ -ОСК определяли путем умножения доли этих клеток на общее количество клеток во флаконе, определенное с помощью камеры Горяева.

Оценка внутриклеточного содержания бисбензимидазолов DB(5,7) в стволовых и нестволовых опухолевых клетках. Благодаря тому, что комплекс DB(*n*)-ДНК обладает достаточно высокой флуоресценцией [33] в рабочем диапазоне современных проточных цитофлуориметров, оснащенных ультрафиолетовым лазером, существует возможность анализа внутриклеточного содержания этих соединений с помощью метода проточной цитометрии. Для оценки внутриклеточного содержания DB(5,7) отдельно в ОСК и в остальных (нестволовых) клетках общую культуру инкубировали с соединениями в концентрации 20 мкМ в течение 72 ч, окрашивали с помощью антител к CD44-ФИТЦ и CD24-ФЭ, как описано выше, затем выполняли исследование с помощью проточного цитометра FACS Vantage, оснащенного двумя лазерами с длинами волн 488 нм и 365 нм. Для измерения флуоресценции ФИТЦ и ФЭ использовали стандартные светофильтры 530/30 нм и 585/42 нм соответственно (при $\lambda_{возб} = 488$ нм). Интенсивность флуоресценции DB(5,7) оценивали в диапазоне 424/44 нм (при $\lambda_{возб} = 365$ нм). Данные о флуоресценции ФИТЦа, ФЭ и DB(5,7) записывали в файл. При последующей обработке данных с помощью программы CellQuestPro выделяли регион $CD44^+CD24^{-/low}$ -клеток, после чего анализировали интенсивность флуоресценции DB(5) или DB(7) в этом регионе и в остальных клетках отдельно.

Определение экспрессии виментина после комбинированного действия бисбензимидазолов DB(5,7) и облучения. В предварительной серии экспериментов изучали экспрессию виментина в различные сроки после облучения в дозе 4 Гр. Экспрессию указанного белка определяли через 24, 48, 72 и 96 ч после радиационного воздействия с помощью проточной цитометрии после иммуноцитохимического окрашивания соответствующими антителами. Для этого клетки снимали со дна культуральных флаконов, из каждого флакона отбирали аликвоты по 250 тыс. клеток, далее клетки фиксировали и хранили в ацетоне при —

20°C. Перед окрашиванием клетки трехкратно отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе с 1% бычьего сывороточного альбумина, после чего инкубировали с моноклональными антителами к виментину, меченными ФЭ, в течение 1 ч при комнатной температуре в соотношении 5 мкл антител/250 тыс. клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела того же изотипа к гемоцианину улитки, конъюгированные с ФЭ. После инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител фосфатно-солевым буферным раствором и медленно анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD Biosciences, США) по показателям интенсивности светорассеяния и флуоресценции ФЭ. С помощью программы CellQuestPro определяли среднюю интенсивность флуоресценции ФЭ в клетках после исключения дэбриса по показателям светорассеяния.

В следующей серии экспериментов изучали влияние DB(5,7) и облучения на экспрессию виментина. Использовали те же условия комбинированного воздействия, что при исследовании количественных изменений пула ОСК, т. е. концентрация соединений составляла 20 мкмоль/л, доза облучения — 4 Гр, а время после облучения (48 ч) было выбрано по результатам описанных выше предварительных экспериментов. Методика подготовки проб к проточноцитометрическому анализу в экспериментах по комбинированному действию DB(*n*) и облучения не отличалась от вышеописанной методики, использованной в предварительных экспериментах по изучению временной зависимости экспрессии виментина после облучения.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили по критерию Манна–Уитни с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Для построения графиков использовали программу Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., США). Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторах. Полученные результаты объединяли. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутриклеточное содержание бисбензимидазолов DB(5) и DB(7) в ОСК и остальных клетках. Внутриклеточное содержание DB(5) и DB(7) оценивали в сравнимых популяциях опухолевых клеток через 72 ч инкубации с соединениями. В течение этого времени могли происходить как накопление, так и откачивание соединений из живых клеток. Как показано на рис. 2, интенсивность флуоресценции как DB(5), так и DB(7) в

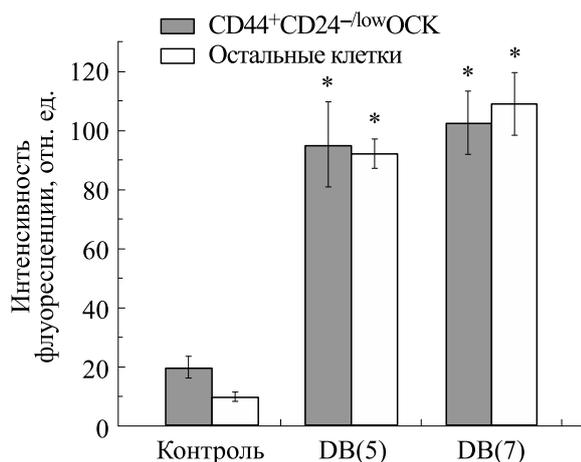


Рис. 2. Средняя интенсивность флуоресценции опухолевых стволовых и нестволовых клеток линии MCF-7, инкубированных с DB(5,7), по данным витального исследования с помощью проточной цитофлуориметрии; * – $p < 0.001$ при сравнении с интенсивностью контрольной аутофлуоресценции.

ОСК и остальных клетках была примерно одинакова, но значительно выше контрольной аутофлуоресценции ($p < 0,001$). Эти данные указывают на то, что исследуемые соединения способны проникать в живые клетки и сохраняться в них в течение длительного времени. При этом важно отметить, что содержание DB(5,7) в ОСК и остальных клетках не отличается, хотя известно, что ОСК способны более эффективно откачивать во внеклеточную среду многие химические соединения, включая традиционные химиопрепараты. В дальнейшем представляет интерес исследовать отдельно процессы накопления и выведения DB(*n*) из клеток изучаемых популяций.

Изменение относительного и абсолютного количества опухолевых стволовых клеток CD44⁺CD24^{-low} после комбинированного действия бисбензимидазолов DB(5) или DB(7) и γ -излучения. Эффекты раздельного и комбинированного действия изучаемых соединений и γ -излучения оценивали через 48 ч после облучения по изменению количества клеток с иммунофенотипом CD44⁺CD24^{-low}.

Установлено, что облучение клеток линии MCF-7 приводит к увеличению относительного количества CD44⁺CD24^{-low} ОСК в 1.7 раза по сравнению с контролем (рис. 3). Предварительная инкубация с DB(5,7) перед облучением значительно снижает этот показатель как по сравнению с раздельным действием облучения, так и по сравнению с интактным контролем. Так, показано, что DB(5) в комбинации с ионизирующим излучением уменьшает относительное количество

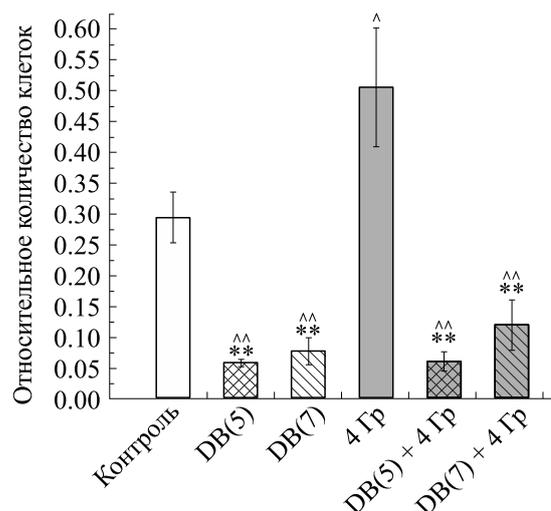


Рис. 3. Изменение относительного количества CD44⁺CD24^{-low} ОСК после раздельного и комбинированного действия DB(5,7) и γ -излучения в дозе 4 Гр. Клетки облучали через 24 ч после добавления соединений, количество ОСК определяли через 48 ч после облучения. Обозначения: ** – $p \leq 0.004$ при сравнении с облучением, ^ – $p < 0.05$ при сравнении с контролем, ^^ – $p \leq 0.006$ при сравнении с контролем.

CD44⁺CD24^{-low} клеток в 4.8 раза по сравнению с контролем: средняя доля ОСК ($\pm SE$) в контроле составляет $0.29 \pm 0.04\%$, доля этих клеток в группе «DB(5) + облучение» – $0.06 \pm 0.01\%$ ($p = 0.002$). DB(7) в комбинации с ионизирующим излучением снижает долю ОСК в меньшей степени – до $0.12 \pm 0.04\%$, т.е. в 2.4 раза по сравнению с контролем ($p = 0.006$). Важно, что DB(5,7) в комбинации с ионизирующим излучением еще сильнее уменьшают относительное количество ОСК по сравнению с раздельным облучением – в 8.2 и 4.1 раза ($p = 0.003$ и $p = 0.004$) соответственно – и тем самым нивелируют стимулирующее влияние облучения на количество CD44⁺CD24^{-low} ОСК.

Интересно, что и одиночное действие DB(5,7) также значимо снижает относительное количество ОСК по сравнению с интактным контролем в 5.8 и 3.6 раза соответственно: средняя доля ОСК в группе «DB(5)» составляет $0.05 \pm 0.01\%$ ($p = 0.001$), в группе «DB(7)» – $0.08 \pm 0.02\%$ ($p = 0.003$).

На рис. 4 представлены данные об изменении абсолютного количества клеток CD44⁺CD24^{-low} после раздельного и комбинированного действия изучаемых соединений и γ -излучения. Показано, что облучение приводит к росту абсолютного количества ОСК в 1.6 раза по сравнению с контролем, в то время как общее количество клеток, напротив, уменьшается в 1.7 раз. Установлено, что в

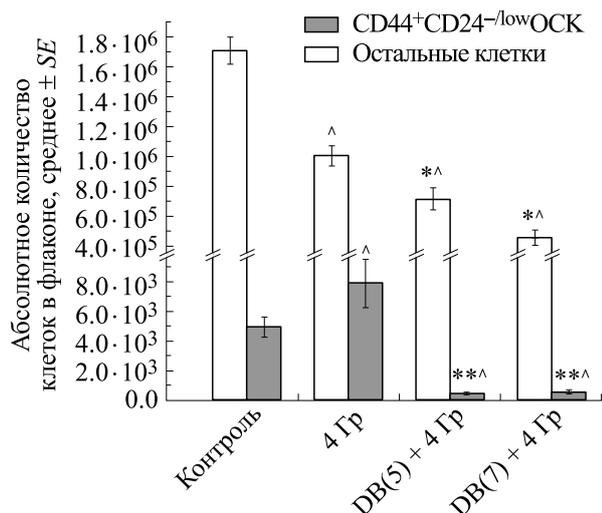


Рис. 4. Изменение абсолютного количества CD44⁺CD24^{-low} OEC и остальных опухолевых клеток после раздельного и комбинированного действия DB(5) или DB(7) и облучения в дозе 4 Гр. Клетки облучали через 24 ч после добавления соединений, количество OEC определяли через 48 ч после облучения. Обозначения: * – $p < 0.05$ при сравнении с облучением, ** – $p < 0.006$ при сравнении с облучением, ^ – $p \leq 0.004$ при сравнении с контролем.

комбинации с ионизирующим излучением как DB(5), так и DB(7) значительно снижают абсолютное количество клеток CD44⁺CD24^{-low} по сравнению с раздельным облучением и контролем. Так, в комбинации с облучением DB(5) приводит к снижению абсолютного количества OEC в 10.4 раза по сравнению с контролем ($p = 0.004$) и в 16.6 раза по сравнению с облучением ($p = 0.006$),

а DB(7) – в 8.9 раза по сравнению с контролем ($p = 0.004$) и в 14.1 раза по сравнению с облучением ($p = 0.006$). При этом количество остальных клеток, составляющих подавляющее большинство, тоже уменьшается после комбинированного действия исследуемых соединений и облучения, но в меньшей степени – в 2.4 и 3.8 раза соответственно по сравнению с контролем ($p = 0.004$ в обоих случаях) и в 1.4 и 2.2 раза соответственно по сравнению с облучением ($p < 0.05$).

Раздельное действие DB(5,7) также приводит к снижению абсолютного количества клеток CD44⁺CD24^{-low} по сравнению с интактным контролем в 7.5 и 5.2 раза ($p = 0.001$ и $p = 0.004$) соответственно. При этом абсолютное количество остальных клеток уменьшается лишь в 1.8 и 3.3 раза ($p = 0.001$ и $p = 0.003$) (данные не показаны).

Изменение экспрессии виментина после раздельного и комбинированного действия бисбензидазолов DB(5,7) и ионизирующего излучения. Как показано с помощью проточной цитометрии, интактные клетки рака молочной железы линии MCF-7 в общей массе не экспрессируют виментин, так как средняя интенсивность флуоресценции клеток, обработанных антителами к этому белку, не отличается от таковой после инкубации с контрольными иммуноглобулинами того же изотипа (рис. 5). Однако через 48–96 ч после облучения в дозе 4 Гр обнаружено специфическое связывание антител к виментину, что свидетельствует об индукции ЭМТ под влиянием γ -излучения. Таким образом, было установлено, что через 48 ч после облучения можно зарегистрировать не только описанное выше увеличение пула OEC, но и радиационно-индуцированный про-

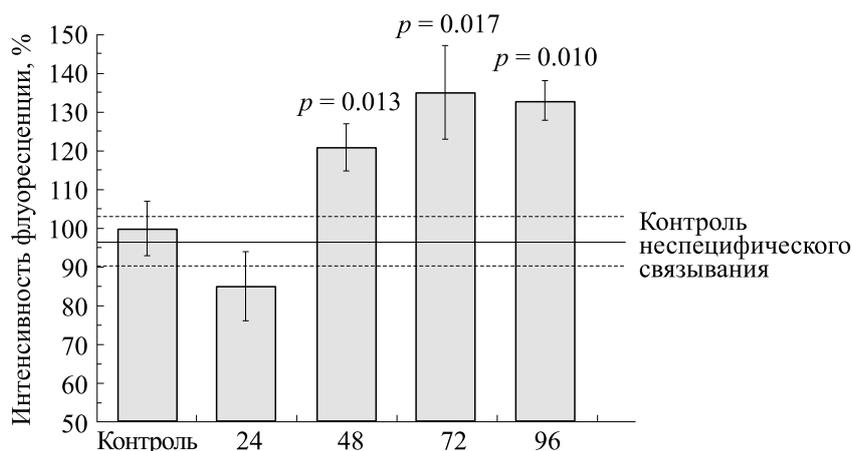


Рис. 5. Уровень экспрессии виментина в различные сроки после облучения клеток линии MCF-7 в дозе 4 Гр. По оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции с антителами к виментину в процентах от контроля (без облучения). Указана величина p при сравнении с контролем неспецифического связывания, среднее значение которого показано сплошной горизонтальной линией, величины SE – пунктирными линиями.

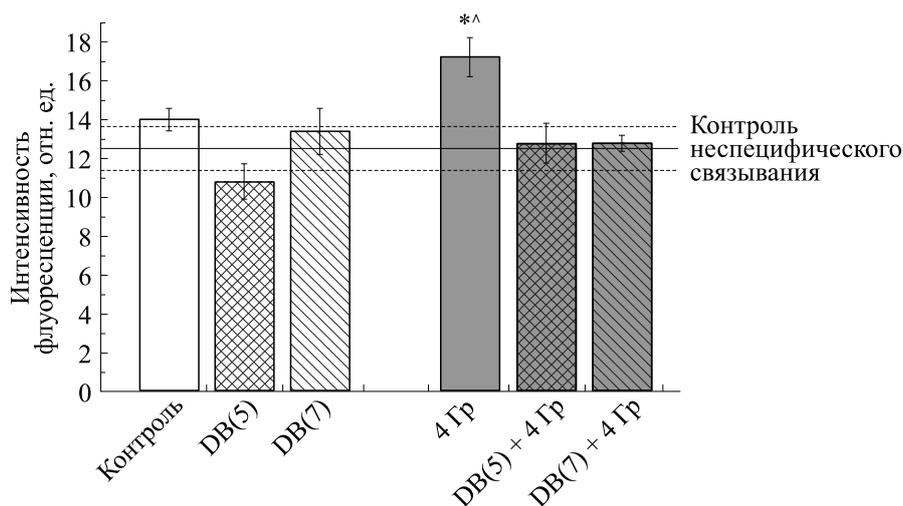


Рис. 6. Интенсивность связывания клеток линии MCF-7 с антителами к виментину после отдельного и комбинированного действия DB(5) или DB(7) и облучения в дозе 4Гр. Через 24 ч после добавления соединений клетки облучали, через 48 ч после облучения выполняли фиксацию клеток для последующего окрашивания и проточнотометрического анализа. Сплошная горизонтальная линия показывает среднюю интенсивность флуоресценции клеток после обработки контрольными иммуноглобулинами (изотипический контроль неспецифического связывания), пунктирные линии отмечают стандартную ошибку ($\pm SE$) средней интенсивности флуоресценции в контроле неспецифического связывания; * – $p = 0.03$ при сравнении с интактным контролем, ^ $p = 0.003$ при сравнении с контролем неспецифического связывания.

цесс ЭМТ. Поэтому эта временная точка была выбрана для дальнейшего исследования комбинированного действия DB(5,7) и ионизирующего излучения на ЭМТ по критерию белковой экспрессии виментина. Интересно отметить, что в исследуемой клеточной культуре через 24 ч после облучения экспрессия виментина еще не обнаруживается, как не удается выявить на этом сроке и повышения количества ОСК (данные не показаны).

Инкубация клеток с DB(5,7) перед облучением и в течение 48 ч после него блокирует радиационную ЭМТ (рис. 6), одновременно снижая размер пула ОСК до уровня ниже, чем в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что одним из важных свойств ОСК является высокая интенсивность откачивания во внеклеточную среду многих химических соединений, включая противоопухолевые препараты, благодаря высокой экспрессии соответствующих АТФ-связывающих транспортеров на клеточной мембране [34]. Нами показано, что внутриклеточное содержание DB(n), где $n = 5$ или 7, примерно одинаково в ОСК и остальных клетках в отличие от многих известных химиопрепаратов. Эта базовая информация позволяет использовать данные соединения для изучения их противоопу-

холевого и радиомодифицирующего действия на ОСК.

В данном исследовании показано, что отдельное облучение приводит к росту доли ОСК, выделенных по иммунофенотипу $CD44^+CD24^{low}$. Эти данные подтверждают более высокую резистентность ОСК к действию редкоизирующего излучения (по сравнению с основной массой опухолевых клеток) и согласуются с результатами многочисленных исследований, в которых использовались различные подходы к идентификации ОСК рака молочной железы как в экспериментальных, так и в клинических условиях [4, 5, 7, 14, 35–37].

В последнее время помимо механизмов высокой радиорезистентности ОСК, приводящих к сохранению их жизнеспособности и пролиферации после облучения, обсуждается еще один механизм увеличения количества ОСК после воздействия редкоизирующего излучения — перепрограммирование дифференцированных опухолевых клеток, выживших после облучения, в опухолевые стволовые клетки [14, 36]. Процесс дедифференцировки может объяснить увеличение не только относительного, но и абсолютного количества ОСК после радиационного воздействия — эффект, который наблюдался нами в данном исследовании при выявлении ОСК по иммунофенотипу и ранее при использовании другого

метода идентификации этих клеток по интенсивному откачиванию флуоресцентного красителя Хехста 33342 [7, 38]. Очевидно, такая дедифференцировка является достаточно редким событием в интактных опухолях/клеточных культурах, но может происходить чаще под влиянием различных факторов, включая ионизирующее излучение. Механизмы этого явления изучались в последние годы во многих лабораториях мира, в результате чего была выяснена роль ЭМТ в поддержании и даже увеличении пула ОСК после облучения путем дедифференцировки нестволовых клеток [29, 36, 39]. Как хорошо известно, радиационное воздействие способно индуцировать ЭМТ опухолевых клеток эпителиального происхождения [29–31], что было подтверждено в данной работе на примере рака молочной железы линии MCF-7 и показано, что повышение белковой экспрессии виментина (одного из основных маркеров ЭМТ) можно зарегистрировать через 48 ч после облучения и в более отдаленные сроки, исследованные в работе (до 96 ч).

В настоящее время накапливаются данные о возможности ингибирования ЭМТ с помощью различных средств, среди которых достаточно эффективными оказались разнообразные модификаторы структуры хроматина [40–42]. В экспериментах с клеточными культурами показано, что блокаторы ЭМТ снижают количество ОСК, поэтому их использование считается очень перспективным в сочетании с традиционными противоопухолевыми воздействиями [43, 44].

Следует отметить, что в процесс перепрограммирования вовлечены эпигенетические механизмы, в том числе изменение метилирования ДНК [45]. Показано, что метилирование ДНК играет непосредственную роль в клеточной миграции, инвазии, метастазировании и ЭМТ опухолевых клеток, а также является важным регуляторным механизмом для поддержания ключевых характеристик ОСК [22, 23, 46]. Логично было предположить, что $DB(n)$, которые обладают ингибирующей активностью в отношении ДНК-метилтрансферазы, способны влиять на размер пула и свойства ОСК путем блокирования ЭМТ. И действительно, при совместном применении $DB(n)$ (где $n = 5$ или 7) и ионизирующего излучения показано отсутствие экспрессии виментина (одного из основных маркеров ЭМТ), что свидетельствует о блокировании радиационно индуцированного процесса ЭМТ. Важно, что при этом, как и ожидалось, происходило снижение относительного и абсолютного количества ОСК. Интересно, что сама по себе инкубация клеток с $DB(5,7)$ приводила к уменьшению количества ОСК не только

по сравнению с таковым при облучении, но и по сравнению с интактным контролем. Можно предположить, что в этом случае эффекты действия изучаемых соединений обусловлены ингибированием спонтанной ЭМТ, которая происходит редко и затрагивает малое число опухолевых клеток, вызывая их дедифференцировку в ОСК, составляющих в контроле лишь 0.29%. Вполне объяснимо, что в интактной культуре MCF-7 не удается зарегистрировать ЭМТ в общей клеточной массе, поскольку этот процесс происходит только в небольшой части клеток, составляющих доли процента от общей популяции. Для подтверждения этого предположения о способности $DB(5,7)$ влиять на спонтанную ЭМТ необходимы дальнейшие исследования экспрессии генов и белковых продуктов, контролирующих этот процесс, в отсортированных ОСК.

В целом полученные результаты согласуются с рядом экспериментальных исследований, в которых показано, что ингибиторы ДНК-метилирования повышают эффективность радиационного воздействия на опухолевые клетки как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [45, 47]. При этом существенно снижается экспрессия генов, контролирующих поддержание ОСК в состоянии дедифференцировки, как показано на примере рака поджелудочной железы [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, внутриклеточное содержание синтетических $DB(n)$, где $n = 5$ или 7 , оказалось одинаковым в опухолевых стволовых и нестволовых клетках. Оба соединения способны нивелировать стимулирующее действие γ -излучения на популяцию ОСК, заключающееся в повышении относительного и абсолютного количества этих клеток. При комбинированном действии $DB(5,7)$ и облучения происходит блокирование радиационно индуцируемого процесса ЭМТ и значительное уменьшение пула ОСК по сравнению не только с облучением, но и с интактным контролем. Возможным механизмом действия изученных соединений на ОСК является ингибирование ДНК-метилирования ряда генов, контролирующих дедифференцировку опухолевых клеток и свойства ОСК, что требует дальнейшего изучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-75-10025).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- R. P. Coppes and A. Dubrovskaya, *Clin. Oncol.* **29**, 329 (2017).
- C. Peitzch, I. Kurth, N. Ebert, et al., *Int. J. Radiat. Biol.* **95**, 1 (2019).
- P. Zhu and Z. Fan, *Biophys. Rep.* **4** (4), 178 (2018).
- N. K. Lytle, A. G. Barber, and T. Reya, *Nat. Rev.* **18**, 669 (2018).
- E. Battle and H. Clevers, *Nat. Med.* **23** (8), 1124 (2017).
- О. Н. Матчук, И. А. Замулаева, Е. И. Селиванова и др., *Радиационная биология. Радиоэкология* **52** (3), 261 (2012).
- О. Н. Матчук и А. С. Саенко, *Радиация и риск* **22** (2), 67 (2013).
- О. Н. Матчук и И. А. Замулаева, *Радиация и риск* **28** (2), 112 (2019).
- J. Kaiser, *Science* **347**, 226 (2015).
- M. Ahmed, K. Chaudhari, R. Babaeli-Jadidi, et al., *Stem Cells* **35**, 839 (2017).
- A. Desai, Y. Yan, and L. S. Gerson, *Stem Cells Translational Medicine* **8** (1), 75 (2019).
- Y. J. Kim, E. L. Siengler, N. Siriwon, and P. Wang, *J. Cancer Metastasis and Treatment* **2**, 233 (2016).
- M. Diehn, R. W. Cho, N. A. Lobo, et al., *Nature* **458** (7239), 780 (2009).
- C. Lagadec, E. Vlashi, L. D. Donna, et al., *Stem Cells* **30**, 833 (2012).
- C.-H. Chang, M. Zang, K. Rajapaksha, et al., *Stem Cell Reports* **5**, 378 (2015).
- S. Skvortsov, I. I. Skvortsova, D. G. Tang, and A. Dubrovskaya, *Stem Cells* **36** (10), 1457 (2018).
- V. Plaks, N. Kong, and Z. Werb, *Cell Stem Cell* **16** (3), 225 (2015).
- Y. Pan, S. Ma, K. Cao, et al., *J. Cancer Research and Therapeutic* **14**, 1469 (2018).
- J. D. Kuhlmann, L. Hein, I. Kurth, et al., *Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry* **16**, 38 (2016).
- T. Nunes, D. Hamdan, C. Leboeuf, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **19** (12). DOI: 10.3390/ijms19124036 1 (2018).
- L. Phi, I. Sari, Y.-G. Yang, et al., *Stem Cells Int.* 2018, Article ID 5416923 (2018). DOI: 10.1155/2018/5416923.
- E. N. Wainwright and P. Scaffidi, *Trends in Cancer* **3** (5), 372 (2017).
- T. B. Toh, J. J. Lim, and E. K.-H. Chow, *Mol. Cancer* **16** (1), Article No 79 (2017). DOI: 10.1186/s12943-017-0596-9.
- A. A. Иванов, В. И. Салаянов, С. А. Стрельцов и др., *Биоорганическая химия* **37** (4), 530 (2011).
- N. A. Cherepanova, A. A. Ivanov, D. V. Maltseva, et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **26**, 295 (2011).
- О. Ю. Сусова, А. А. Иванов, С. С. Моралес Руис и др., *Биохимия* **75** (6), 781 (2010).
- К. А. Чурюкина, И. А. Замулаева, А. А. Иванов и др., *Радиационная биология. Радиоэкология* **57** (2), 136 (2017).
- N. Loret, H. Denys, P. Tummeres, et al., *Cancers* **11** (6), 838 (2019). DOI: 10.3390/cancers11060838.
- S. Y. Lee, E. K. Jeong, M. K. Ju, et al., *Mol. Cancer* **16** (1), Article No 10 (2017). DOI: 10.1186/s12943-016-0577-4.
- H.-R. Park, S.-K. Jo, and U. Jung, *In Vivo* **33** (6), 1773 (2019).
- J. Lu, Y. Zhong, J. Chen, et al., *Cell Physiol. Biochem.* **50**, 721 (2018).
- M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (7), 3983 (2003).
- К. В. Попов, Е. И. Егорова, А. А. Иванов и др., *Биол. мембраны* **25** (3), 173 (2008).
- R.-R. Begicevic and M. Falasca, *Int. J. Mol. Sci.* **18** (11), 2362 (2017). DOI: 10.3390/ijms18112362.
- M. Krause, A. Dubrovskaya, A. Linge, et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* **109**, 63 (2017).
- F. Li, K. Zhou, B. Zhang, et al., *Oncol. Lett.* **12**, 3059 (2016).
- И. А. Замулаева, О. Н. Матчук, Е. И. Селиванова и др., *Радиационная биология. Радиоэкология* **54** (3), 256 (2014).
- О. Н. Матчук, Н. В. Орлова и И. А. Замулаева, *Радиационная биология. Радиоэкология* **56** (5), 487 (2016).
- H.-C. Chi, C.-Y. Tsai, M.-M. Tsai, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **18** (9), 1903 (2017). DOI: 10.3390/ijms18091903.
- T. Boulding, R. D. McCuaig, A. Tan, et al., *Sci. Rep.* **8**, Article No 73 (2018). DOI: 10.1038/s41598-017-17913-x.
- S. Ambrosio, C. D. Sacca, and B. Majello, *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regulatory Mechanisms* **1860**, 905 (2017).
- A. Kanamoto, I. Ninomiya, S. Harada, et al., *Int. J. Oncol.* **49**, 1858 (2016).
- M. Garg, *World J. Stem Cells* **9** (8), 118 (2017).
- S. Kotiyal and S. Bhattacharya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 112 (2014).
- R. I. Miousse, R. K. Kutanzi, and I. Koturbash, *Int. J. Radiat. Biol.* **93**, 457 (2017).
- M. W. Luczak and P. P. Jagodzinski, *Folia Histochem. Cytobiol.* **44** (3), 143 (2006).
- H.-M. Kwon, E.-J. Kang, K. Kang, et al., *Oncotarget* **8** (51), 89005 (2017).

Outcomes of the Combined Effects of Dimeric Bisbenzimidazoles and Exposure to Ionizing Radiation on MCF-7 Breast Cancer Stem Cells

K.A. Churyukina*, A.L. Zhuze**, A.A. Ivanov**, and I.A. Zamulaeva*

*A. Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Koroleva 4, Obninsk, Kaluga Region, 249036 Russia

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The study aims to determine how to eliminate and/or increase radiosensitivity of a population of cancer stem cells, which are responsible for radioresistance in malignant neoplasms. The single and combined effects of γ -radiation at a dose of 4 Gy and dimeric bisbenzimidazoles of DB(n) series with the number of groups in the methylene linker connecting two benzimidazoles, $n = 5$ or 7 on the cancer stem cells were studied in the MCF-7 human breast cancer cell line. It was shown that DB(5) significantly reduces the relative and absolute number of cancer stem cells by a factor of 5.8 and 7.5 compared to control, respectively ($p = 0.001$ in both cases), DB(7) – by a factor of 3.6 ($p = 0.003$) and 5.2 ($p = 0.004$), respectively. The single irradiation resulted in an increase of the relative and absolute number of cancer stem cells by a factor of 1.7 and 1.6 ($p < 0.05$) compared to control, respectively. The combined effects of DB(5,7) and exposure to ionizing radiation resulted in a significant decrease in the relative number of cancer stem cells by a factor of 8.2 and 4.1, respectively, as opposed to the effects after single radiation exposure ($p = 0.003$ and $p = 0.004$). Even more pronounced outcomes of the combined effects of DB(5,7) and exposure to radiation were found with regard to the absolute number of cancer stem cells, which decreased by a factor of 16.6 and 14.1, respectively, compared to those after single irradiation ($p = 0.006$ in both cases). DB(5,7) in combination with ionizing radiation inhibits radiation-induced epithelial-mesenchymal transition as it was shown by the expression of vimentin, one of the markers linked to this process, vimentin plays an important role in the formation of the cancer stem cell pool.

Keywords: cancer stem cells, dimeric bisbenzimidazoles, ionizing radiation, combined effect, flow cytometry