

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 615.2:539.1.047:616-006.66:57.085.23

ПОВЫШЕНИЕ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ MCF-7, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ВИДЕ МАММОСФЕР, К γ - И γ -НЕЙТРОННОМУ ОБЛУЧЕНИЮ С ПОМОЩЬЮ МЕТФОРМИНА

© 2022 г. В. Г. Шуватова^{а,*}, А. П. Кувырченкова^а, Ю. П. Сёмочкина^а, Е. Ю. Москалёва^а

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: Shuvatova_VG@nrcki.ru

Поступила в редакцию 04.07.2021 г.

После доработки 21.01.2022 г.

Принята к публикации 02.03.2022 г.

Опухолевые стволовые клетки (ОСК) обладают высокой устойчивостью к химио- и лучевой терапии. Цель работы – изучение влияния метформина на радиочувствительность клеток маммосфер линии MCF-7, обогащенных ОСК. Клетки маммосфер линии MCF-7 подвергали воздействию γ -излучения в дозе 2 Гр или реакторного γ ,n-излучения в дозе 1 Гр через 1 ч после добавления метформина в нетоксичной концентрации 0.25 ммоль/л, который удаляли через 24 ч культивирования. Через 6 сут после облучения подсчитывали общее количество клеток маммосфер в камере Горяева, затем определяли процент ОСК с фенотипом CD44⁺/CD24^{-/low} и рассчитывали количество ОСК в образцах. После воздействия γ ,n-излучения происходило достоверно более глубокое снижение общего количества клеток маммосфер и ОСК в их составе, чем после γ -излучения. При совместном действии метформина и γ - или γ ,n-излучения общее количество клеток маммосфер и ОСК было меньше по сравнению с действием только соответствующего вида излучения ($p < 0.05$). Таким образом γ ,n-излучение является более эффективным в отношении элиминации ОСК линии MCF-7, чем γ -излучение. Метформин повышает радиочувствительность ОСК линии MCF-7 к γ - и γ ,n-облучению.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки, аденокарцинома молочной железы, линия MCF-7, маммосферы, метформин, γ -излучение, γ ,n-излучение, радиорезистентность, радиосенсибилизация

DOI: 10.31857/S0869803122030109

Современная иерархическая модель онкогенеза предполагает существование в злокачественных образованиях любой локализации опухолевых стволовых клеток (ОСК), способных как к самообновлению и поддержанию собственной популяции, так и к формированию ограниченно пролиферирующих клеток-предшественников более дифференцированных опухолевых клеток. Поэтому несмотря на то что основная масса опухоли состоит из злокачественных клеток той или иной степени дифференцировки, ее рост и развитие определяются минорной популяцией ОСК [1]. Впервые существование ОСК в солидных опухолях было продемонстрировано на примере аденокарциномы молочной железы человека. М. Al-Hajj и соавт. показали, что из всех опухолевых клеток только небольшая популяция с фенотипом CD44⁺/CD24^{-/low} способна индуцировать развитие злокачественных новообразований у иммунодефицитных мышей [2]. На сегодняшний день

считается, что ОСК во многом определяют исход лечения онкологических заболеваний, так как именно эти клетки играют ключевую роль в прогрессии опухолевого процесса, в том числе в формировании метастазов [3].

ОСК характеризуются резистентностью к химио- и лучевой терапии. Известно, что устойчивость ОСК к облучению определяется высокой эффективностью репарации повреждений ДНК; состоянием пролиферативного покоя; высоким содержанием антиоксидантов (повышенная экспрессия генов, контролирующих синтез глутатиона, супероксиддисмутазы, каталазы); высокой активностью антиапоптотических сигнальных путей, в том числе STAT3, Wnt, Notch, Hedgehog, NF- κ B, PI3K/Akt/mTOR [4]. Все перечисленные особенности метаболизма обеспечивают выживаемость ОСК во время облучения и ускоренную пролиферацию этих клеток после радиационного воздействия.

В последние годы в связи с активным развитием корпускулярной радиотерапии становятся актуальными исследования радиочувствительности ОСК к плотноионизирующему излучению, в том числе к γ -нейтронному (γ, n) излучению. Согласно немногочисленным имеющимся данным, γ, n -излучение, в отличие от γ -излучения, не приводит к увеличению доли ОСК, что свидетельствует о более высокой радиочувствительности этих клеток к облучению нейтронами [5]. Это позволяет полагать, что нейтронная терапия будет иметь ряд преимуществ по сравнению с использованием γ -излучения в отношении воздействия на ОСК.

Исходя из вышесказанного, актуальной задачей является поиск эффективных способов элиминации ОСК, в том числе поиск препаратов, способных повышать их радиочувствительность к разным типам ионизирующего излучения. Одним из таких веществ может быть противодиабетический препарат метформин. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что метформин повышает радиочувствительность клеток немелкоклеточного рака легких [6]. Кроме того, Н. Hirsch и соавт. обнаружили, что метформин в концентрации 0.1–0.3 ммоль/л снижает количество ОСК в культурах клеток рака молочной железы различных линий и при этом не влияет на количество нормальных (неопухолевых) клеток при культивировании в течение 24–48 ч [7].

Известны два механизма противоопухолевого действия метформина. Прямой механизм связан с активацией АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК). Метформин, ингибируя комплекс I цепи переноса электронов, приводит к повышению соотношения АМФ/АТФ в клетке, в результате чего происходит активация АМФК. АМФК, в свою очередь, ингибирует внутриклеточный путь mTOR, который, как известно, играет ключевую роль в нерегулируемом росте злокачественных опухолей [8]. Косвенный механизм противоопухолевой активности метформина связан с уменьшением количества рецепторов к инсулину на опухолевых клетках и снижением активности инсулин-зависимых сигнальных путей, таких как PI3K/Akt/mTOR и MEK/ERK1/2. Эти эффекты приводят к ингибированию роста опухоли и ее метастатического потенциала [9].

В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния метформина на радиочувствительность клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, культивируемых в виде маммосфер, обогащенных ОСК, к γ - и γ, n -облучению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. Культуру маммосфер получали из клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, которые культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина (Life Technologies, США) при 37°C и 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. Клетки снимали с подложки с помощью 0.05%-ного раствора трипсина в растворе Версена, центрифугировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, Sigma-Aldrich, Германия) и помещали в концентрации 20 клеток/мкл в низкоадгезивные культуральные чашки (Corning Costar, США), содержащие среду DMEM/F12 без фенолового красного (Gibco, США) с добавлением 20 нг/мл EGF (Calbiochem, Германия), 10 нг/мл bFGF (PeproTech, США), 2% B27 (Gibco, США), 10 мкг/мл инсулина (Calbiochem, Германия), 4 мкг/мл гепарина (Serva, Германия), 50 мкг/мл гентамицина (Life Technologies, США) – полная ростовая среда. Через 6 дней формировались колонии сферической формы 50–150 мкм в диаметре – маммосферы, которые собирали центрифугированием, диссоциировали с помощью раствора протеаз TrypLe Express (Gibco, Дания) в соответствии с рекомендациями производителя на отдельные клетки и продолжали культивировать в низкоадгезивных условиях в полной ростовой среде.

Определение нетоксичной концентрации метформина для клеток маммосфер линии MCF-7. Маммосферы диссоциировали и клетки помещали в низкоадгезивные 6-луночные планшеты в количестве 50000 клеток/луночка (20 клеток/мкл) в среде DMEM/F12 без факторов и добавок, содержащую метформин (Sigma-Aldrich, США) в концентрациях 0; 0.2; 1; 5 и 25 ммоль/л, в трех параллелях. Через 24 ч все образцы центрифугировали и клетки помещали в свежую полную ростовую среду, не содержащую метформин. Через 6 сут после добавления препарата определяли количество клеток в образцах. Для этого маммосферы собирали центрифугированием, диссоциировали на отдельные клетки и количество клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева. Количество клеток оценивали в процентах от необработанного контроля.

Облучение клеток. Маммосферы диссоциировали и готовили суспензию клеток в среде DMEM/F12 без факторов и добавок. За 1 ч до облучения к части образцов добавляли метформин (Sigma-Aldrich, США) в предварительно подобранной нетоксичной концентрации 0.25 ммоль/л. Клетки маммосфер подвергали действию γ -излучения на установке “ГУТ-200М” (источник ⁶⁰Co) в дозе 2 Гр при мощности дозы 0.75 Гр/мин. γ, n -Облучение проводили в дозе 1 Гр при мощности дозы 0.07 Гр/мин на горизонтальном экспери-

ментальном канале (ГЭК-1) реактора “ИР-8” НИЦ “Курчатовский институт”. Пучок нейтронов и γ -квантов формировался с помощью коллиматора из стали и борированного полиэтилена. Условия облучения и расчет поглощенных доз подробно описаны ранее [10]. Плотность нейтронного потока, приведенная к 1 МВт мощности реактора, равнялась $0.71 \pm 0.07 \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Энергетический диапазон нейтронов — от 0.5 эВ до 10 МэВ. Расчетная (с использованием программного пакета Geant4) мощность поглощенной в образце дозы, приведенная к 1 МВт мощности реактора, равнялась $0.6 \pm 0.1 \text{ Гр/ч}$. Из них 0.2 Гр/ч обусловлено облучением нейтронами, а 0.4 Гр/ч — γ -квантами. Образцы клеток в тонкостенной пластиковой пробирке размещали непосредственно на выходе пучка из коллиматора. После облучения клетки культивировали в количестве 50000 клеток в лунке (20 клеток/мкл) в низкоадгезивных 6-луночных планшетах в полной ростовой среде в трех параллелях с сохранением концентрации метформина 0.25 ммоль/л в образцах, к которым препарат был добавлен до облучения. Через 24 ч после облучения все образцы центрифугировали и клетки помещали в свежую среду, не содержащую метформин.

Определение общего количества клеток. Через 6 сут после облучения определяли общее количество клеток в образцах. Для этого маммосферы собирали центрифугированием, диссоциировали на отдельные клетки, как описано выше, и количество клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева.

Определение доли ОСК. Долю ОСК определяли с помощью проточной цитофлуориметрии как процент клеток с фенотипом $\text{CD44}^+/\text{CD24}^{-/\text{low}}$. Клетки центрифугировали в холодном буфере для окрашивания, состоящем из ФСБ, 0,1% азида натрия (Merck, Германия) и 0,1% бычьего сывроточного альбумина (Диаэм, Россия), и инкубировали в холодном буфере для окрашивания с мечеными флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) мышиными моноклональными антителами к человеческому CD44 (клон: VJ18, Biolegend, США) и с мечеными фикоэритрином (ФЭ) мышиными моноклональными антителами к человеческому CD24 (клон: ML5, Biolegend, США) в разведении 1:20 в темноте при $+4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Неспецифическое связывание оценивали при инкубации клеток интактной культуры маммосфер с антителами изотипического контроля, конъюгированными с соответствующими флуорохромами: мышиный IgG1, к меченный ФИТЦ (Biolegend, США), и мышиный IgG2a, к меченный ФЭ (Biolegend, США). Относительное содержание ОСК определяли среди клеток основной популяции, выделяемой на графике распределения клеток по прямому и боковому светорассея-

нию, с последующим исключением агрегатов. Для определения области, соответствующей положению клеток с фенотипом ОСК ($\text{CD44}^+/\text{CD24}^{-/\text{low}}$), курсор по оси X (CD44 -ФИТЦ) устанавливали по уровню области неспецифического связывания. Положение курсора по оси Y (CD24 -ФЭ) для определения клеток с низким уровнем антигена CD24 устанавливали на уровне 25% от средней интенсивности флуоресценции ФЭ клеток контрольной культуры маммосфер. Анализ проводили на приборе FACSCalibur (BD Biosciences, США, ресурсный центр молекулярной и клеточной биологии).

Определение количества ОСК. Используя полученные данные по общему количеству клеток и доле ОСК в культуре, рассчитывали количество ОСК в образцах по формуле: количество ОСК = общее количество клеток в образце \times доля ОСК/100%.

Статистический анализ. Обработку полученных результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента с помощью компьютерной программы Origin 8.1. Данные представляли в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Культивирование клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 в виде маммосфер в бессывороточной среде с добавлением необходимых факторов роста и специальных добавок, указанных в разделе “Материалы и методика”, позволяет получать культуры, обогащенные ОСК [11], что необходимо для исследования эффективности различных воздействий на эту субпопуляцию опухолевых клеток.

Первым этапом работы был выбор нетоксичной концентрации метформина для клеток такой культуры. Влияние препарата на выживаемость клеток маммосфер оценивали по изменению их количества путем подсчета в камере Горяева в зависимости от концентрации метформина, который удаляли через 24 ч культивирования, а клетки переносили в свежую полную культуральную среду.

Полученные результаты представлены на рис. 1.

Нетоксичная концентрация препарата не должна в выбранных условиях снижать выживаемость клеток более чем на 5% по сравнению с необработанным контролем. Как видно из графика дозовой зависимости на рис. 1, концентрация метформина 0.25 ммоль/л с учетом ошибки не приводила к снижению количества клеток маммосфер, превышающему 5%. Эту концентрацию считали нетоксичной и использовали во всех последующих экспериментах.

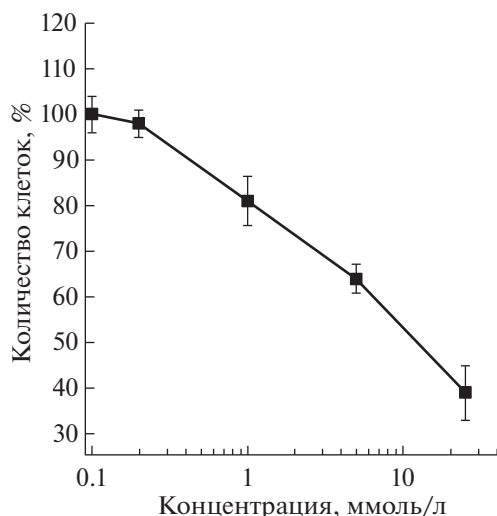


Рис. 1. Влияние метформина на выживаемость клеток линии MCF-7, культивируемых в виде маммосфер. К клеткам маммосфер добавляли метформин в концентрациях 0; 0.2; 1; 5 и 25 ммоль/л. Через 24 ч клетки отмывали от препарата. Через 6 сут после добавления метформина маммосферы диссоциировали и подсчитывали количество клеток в культуре.

Fig. 1. The effect of metformin on the survival of MCF-7 cells cultured as mammospheres. Metformin was added to mammospheres at concentrations of 0, 0.2, 1, 5, and 25 mmol/l. After 24 h, the cells were washed from the drug. Six days after the addition of metformin, the mammospheres were dissociated and the number of cells was counted.

Данные, полученные при исследовании влияния метформина на радиочувствительность культуры маммосфер линии MCF-7, к γ - и γ,n -облучению, оцениваемую по изменению числа клеток через 6 сут после облучения, представлены на рис. 2.

Присутствие метформина в концентрации 0.25 ммоль/л в течение 24 ч в ростовой среде не влияло на общее количество клеток маммосфер. γ -Облучение приводило к снижению общего количества клеток на 14%, а γ,n -облучение – на 60% относительно контроля. При совместном действии метформина и облучения общее количество клеток маммосфер уменьшилось на 47% относительно контроля в случае γ -облучения и на 77% относительно контроля в случае γ,n -облучения. Таким образом, после γ,n -облучения наблюдали достоверно ($p < 0.05$) более глубокое снижение общего количества клеток маммосфер, чем после γ -облучения, а метформин усиливал действие как редко-, так и плотноионизирующего излучения.

Долю ОСК в культуре маммосфер определяли с помощью проточной цитометрии как фракцию клеток с фенотипом CD44⁺/CD24^{-/low}. Примеры гистограмм, полученных при анализе доли ОСК в культуре маммосфер через 6 сут после γ - или

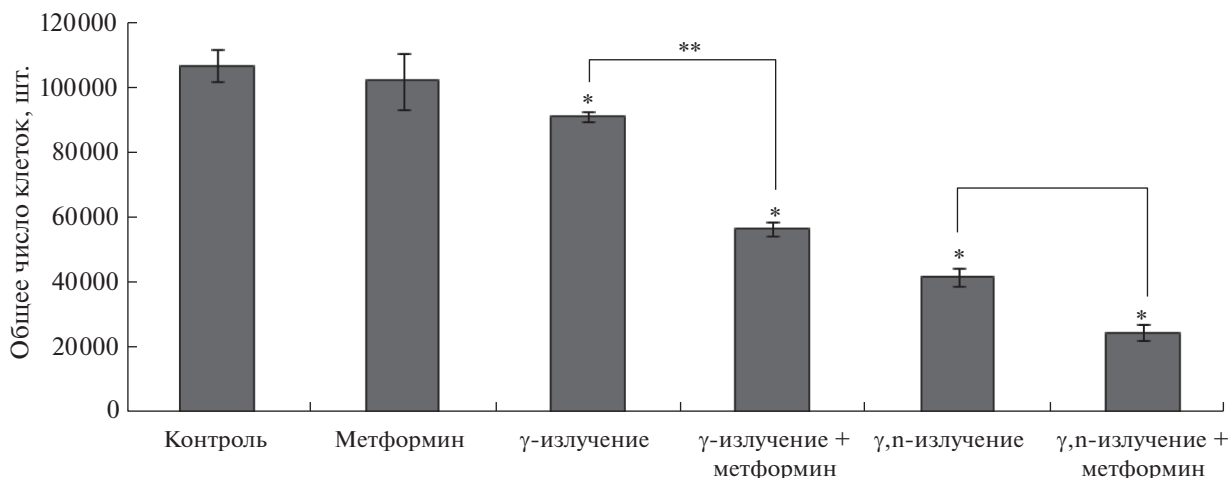


Рис. 2. Влияние γ - или γ -нейтронного (γ,n -) излучения и метформина по отдельности и совместно на общее количество клеток маммосфер. За 1 ч до облучения к части образцов добавляли метформин в концентрации 0.25 ммоль/л, затем клетки подвергали воздействию γ -излучения в дозе 2 Гр или γ,n -излучения в дозе 1 Гр. Суммарное время культивирования с препаратом составило 24 ч. Через 6 сут после облучения диссоциировали маммосферы и подсчитывали количество клеток в культуре.

* $p < 0.05$ отличия от контроля статистически значимы; ** $p < 0.05$ отличия между группами статистически значимы.

Fig. 2. The effects of an separate and combined exposure to γ - or γ,n -radiation and metformin on the total number of MCF-7 cells cultivated as mammospheres. One hour before irradiation, metformin was added to a part of the samples at a concentration of 0.25 mmol/l. Then the cells were exposed to γ -radiation at a dose of 2 Gy or γ,n -radiation at a dose of 1 Gy. The total time of cultivation with the drug was 24 h. Six days after irradiation, the mammospheres were dissociated and the number of cells was counted.

* $p < 0.05$ differences from the control are statistically significant; ** $p < 0.05$ differences between the groups are statistically significant.

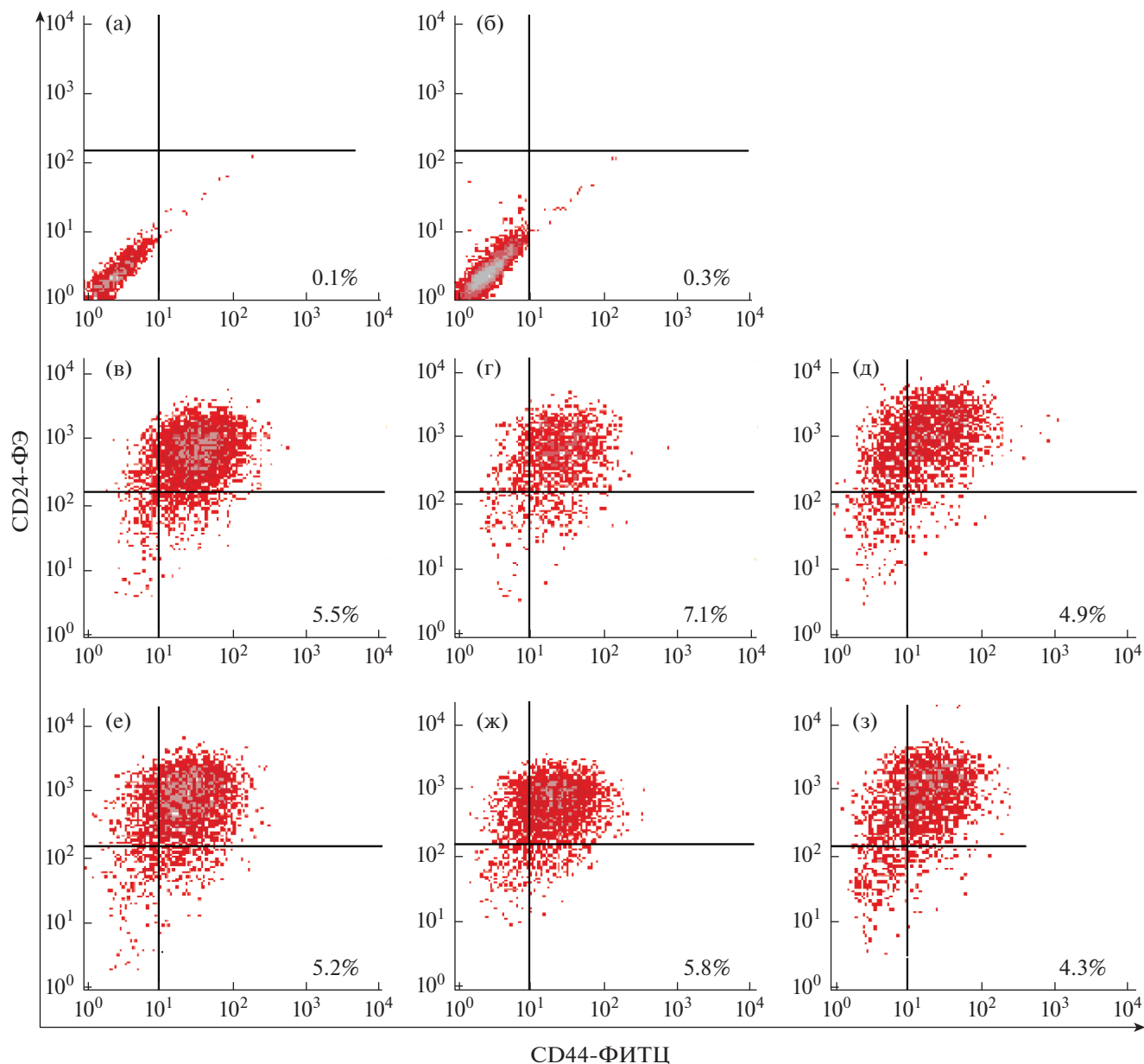


Рис. 3. Оценка аутофлуоресценции (а) и неспецифического связывания контрольной культуры маммосфер (б) и примеры определения доли ОСК в контрольной культуре (в), после воздействия γ -излучения (г), γ ,n-излучения (д), метформина (е), γ -излучения совместно с метформином (ж) и γ ,n-излучения совместно с метформином (з). Для определения доли ОСК за 1 ч до облучения к части образцов добавляли метформин в концентрации 0.25 ммоль/л, затем клетки подвергали воздействию γ -излучения в дозе 2 Гр или γ ,n-излучения в дозе 1 Гр. Суммарное время культивирования с препаратом составило 24 ч. Через 6 сут после облучения диссоциировали маммосферы и окрашивали клетки антителами к CD24 и CD44. Долю ОСК в культуре определяли как фракцию клеток с фенотипом $CD44^+/CD24^{-/low}$. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции ФИТЦ (CD44), отн. ед.; по оси ординат – интенсивность флуоресценции ФЭ (CD24), отн. ед. Цифрами указана доля ОСК в культуре.

Fig. 3. Assessment of autofluorescence (a) and non-specific binding of the control culture of mammospheres (b) and examples of determining the percentage of CSCs in a control culture (c), after exposure to γ -radiation (d), γ ,n-radiation (e), metformin (f), γ -radiation with metformin (g), γ ,n-radiation with metformin (h). One hour before irradiation, metformin was added to a part of the samples at a concentration of 0.25 mmol/l. Then the cells were exposed to γ -radiation at a dose of 2 Gy or γ ,n-radiation at a dose of 1 Gy. The total time of cultivation with the drug was 24 h. Six days after irradiation, the mammospheres were dissociated and the cells were stained with CD24 and CD44 antibodies. The CSCs was determined as the cells with the $CD44^+/CD24^{-/low}$ phenotype.

In the X-axis – the intensity of FITC fluorescence (CD44), rel. units. In the Y-axis – the intensity of PE fluorescence (CD24), rel. units. The numbers indicate the proportion of CSC in the culture.

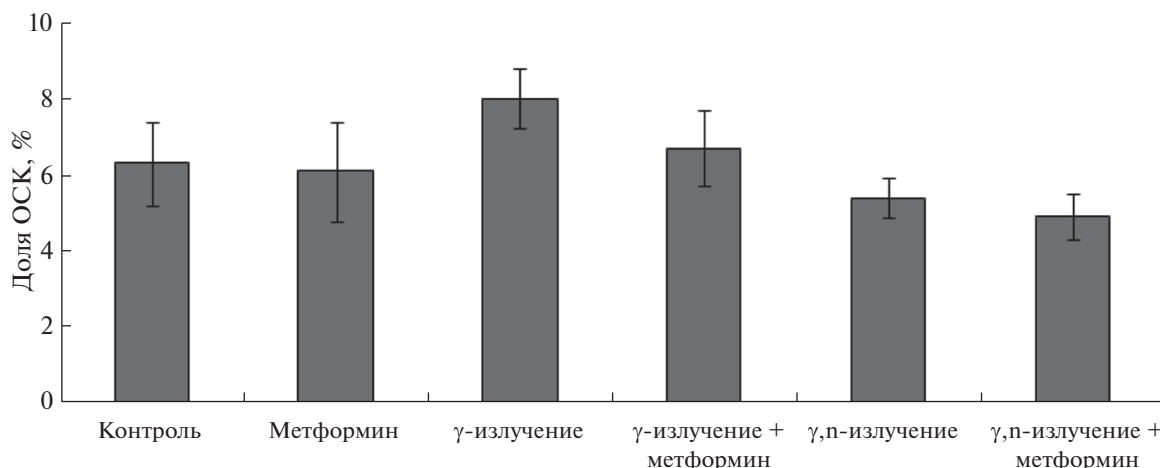


Рис. 4. Влияние γ- или γ-нейтронного (γ,n-) излучения и метформина по отдельности и совместно на долю ОСК в составе маммосфер.

Fig. 4. The effect of an separate and combined exposure to γ-or γ,n-radiation and metformin on the percentage of CSCs in mammospheres.

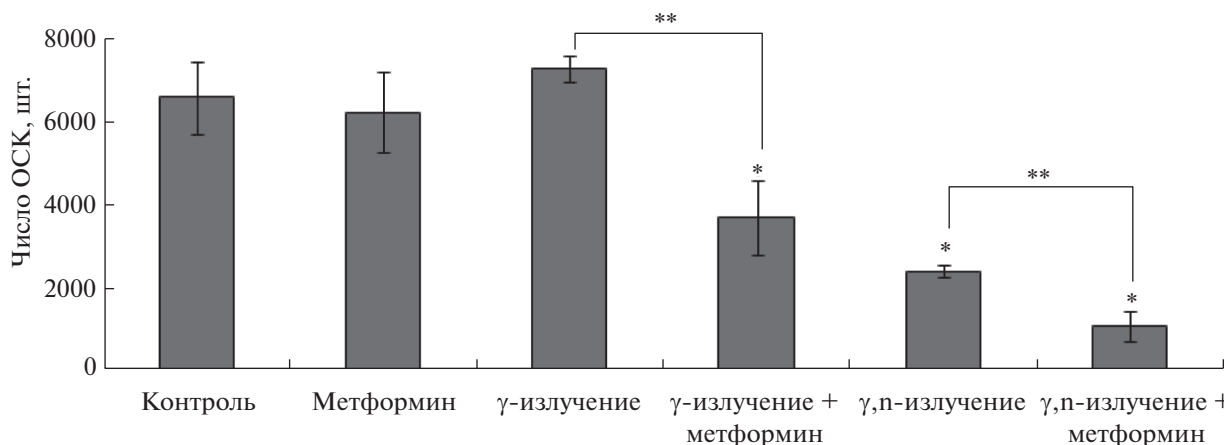


Рис. 5. Влияние γ- или γ-нейтронного (γ,n-) излучения и метформина по отдельности и совместно на количество ОСК в составе маммосфер. Количество ОСК рассчитывали, исходя из полученных данных по общему количеству клеток маммосфер и доли ОСК в культуре.

* $p < 0.05$ отличия от контроля статистически значимы; ** $p < 0.05$ отличия между группами статистически значимы.

Fig. 5. The effect of an separate and combined exposure to γ-or γ,n-radiation and metformin on the number of CSCs in mammospheres. The number of CSCs was calculated based on the obtained data on the total number of cells and the percentage of CSCs in the culture.

* $p < 0.05$ differences from the control are statistically significant; ** $p < 0.05$ differences between the groups are statistically significant.

γ,n-облучения без метформина и совместно с препаратом, представлены на рис. 3.

Средняя доля ОСК в контрольной культуре составила $6.3 \pm 1.1\%$, а в присутствии метформина – $6.1 \pm 1.3\%$. После действия γ- и γ,n-излучения средняя доля ОСК была равна 8.0 ± 0.9 и $5.4 \pm 0.5\%$ соответственно, а при совместном действии метформина и γ- или γ,n-излучения – 6.7 ± 1.0 и $4.9 \pm 0.6\%$ соответственно (рис. 4).

Средняя доля ОСК в контрольной культуре составила $6.3 \pm 1.1\%$, а в присутствии метформина –

$6.1 \pm 1.3\%$. После действия γ- и γ,n-излучения средняя доля ОСК была равна 8.0 ± 0.9 и $5.4 \pm 0.5\%$ соответственно, а при совместном действии метформина и γ- или γ,n-излучения – 6.7 ± 1.0 и $4.9 \pm 0.6\%$ соответственно (рис. 4).

Используя полученные данные об общем количестве клеток и доле ОСК, рассчитывали количество ОСК в образцах. Полученные результаты о влиянии γ- или γ,n-излучения и метформина по отдельности и совместно на количество ОСК в составе маммосфер представлены на рис. 5.

В выбранных условиях эксперимента метформин не оказывал влияния на количество ОСК в культуре необлученных маммосфер. После γ -облучения обнаружено незначительное увеличение количества ОСК — на 10% относительно контроля. При этом γ , β -облучение приводило к снижению количества ОСК на 63% относительно контроля. Таким образом, радиочувствительность ОСК, оцениваемая по их количеству, была достоверно ($p < 0.05$) выше к γ , β -облучению, чем к γ -облучению. При совместном действии метформина и γ -излучения количество ОСК снижалось на 44% относительно контроля, а при совместном действии препарата и γ , β -излучения — на 83% относительно контроля. Таким образом, добавление метформина в культуральную среду перед облучением клеток усиливало цитотоксический эффект обоих видов излучения, приводя к достоверно ($p < 0.05$) более глубокому уменьшению количества ОСК в составе маммосфер по сравнению с действием только излучения.

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам, представленным на рис. 2 и 4, видно, что через 6 сут после γ -облучения общее количество клеток маммосфер линии MCF-7 достоверно уменьшается, тогда как количество ОСК незначительно увеличивается по сравнению с контролем, что свидетельствует о более высокой устойчивости ОСК к действию γ -излучения. Эти данные коррелируют с результатами исследований, в которых было обнаружено увеличение доли ОСК в разных типах опухолей после воздействия γ -излучения [12, 13].

В индуцированное излучением увеличение количества ОСК, помимо повышения активности указанных выше внутриклеточных каскадов, усиливающих пролиферацию клеток, определенный вклад может вносить активация эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) опухолевых клеток. Было показано, что под воздействием ионизирующего излучения возможно перепрограммирование более дифференцированных клеток опухоли, и их переход в пул ОСК [14].

ЭМП активируется в ответ на метаболический стресс и регулируется различными сигнальными молекулами, в том числе факторами роста (TGF- β , EGF) и связанными с ними белками внутриклеточных сигнальных каскадов (Wnt, Notch, Hedgehog, PI3K/Akt) [15].

В отличие от γ -облучения, γ , β -облучение приводило к достоверному снижению не только общего количества клеток маммосфер, но и количества ОСК по сравнению с контролем. Таким образом, показана более высокая радиочувствительность ОСК к γ , β -облучению. Полученные результаты позволяют полагать, что этот тип излучения будет

более эффективным в отношении элиминации ОСК, чем γ -излучение. Известно, что высокоинтенсивное излучение приводит к образованию большого количества свободных радикалов и более сложных, трудно репарируемых двунитевых разрывов ДНК по сравнению с редкоионизирующим излучением, что может быть одной из причин более выраженного цитотоксического эффекта γ , β -излучения [16].

Метформин, добавленный к культуре маммосфер линии MCF-7 в нетоксичной концентрации, повышал радиочувствительность ОСК как к γ -, так и к γ , β -облучению, что выражалось в достоверном более глубоком снижении количества опухолевых клеток по сравнению с действием только излучения. Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют предположить, что радиосенсибилизирующее действие метформина в отношении ОСК опосредовано двумя путями. Первый путь связан с непосредственным увеличением повреждающего действия излучения на клетки. Ингибируя комплекс I цепи переноса электронов, метформин снижает синтез АТФ, в результате чего угнетаются процессы, требующие затраты энергии, в том числе репарация радиационных повреждений ДНК [17]. Также обнаружено, что метформин предотвращает активацию каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs), что также приводит к снижению уровня репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК [18]. Кроме того, ингибируя цепь переноса электронов, метформин увеличивает количество активных форм кислорода в клетках, которые способствуют увеличению повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением [16]. Второй путь связан с угнетением механизмов, способствующих поддержанию пула ОСК и их выживанию после радиационного воздействия, в том числе ингибированию сигнального каскада PI3K/AKT/mTOR, который, как было сказано выше, играет важную роль в ускоренной репопуляции ОСК, а также осуществлении ЭМП.

Помимо указанных биохимических особенностей, радиоустойчивость ОСК в опухоли определяется их преимущественной локализацией в гипоксических нишах, что способствует выживанию ОСК во время лучевой терапии [19]. Являясь ингибитором цепи переноса электронов, метформин позволяет преодолеть радиорезистентность, связанную с гипоксическими условиями в опухоли, благодаря снижению использования молекулярного кислорода и накоплению его избытка в ткани [20]. Это позволяет ожидать, что метформин будет эффективен в качестве радиосенсибилизатора и на организменном уровне.

Нужно отметить, что общее количество клеток маммосфер после воздействия метформина и из-

лучения было на 38 и 41% меньше, чем после воздействия только γ - или γ, n -излучения соответственно. При этом количество ОСК, входящих в состав маммосфер, после воздействия метформина и излучения было на 49 и 54% меньше, чем после воздействия только γ - или γ, n -излучения соответственно. Эти результаты свидетельствуют о преимущественном влиянии метформина на радиочувствительность ОСК и позволяют рассматривать его в качестве сенсibilизатора ОСК как к γ -, так и γ, n -облучению.

При длительном приеме метформина в терапевтических дозах его максимальная концентрация в плазме составляет в среднем 2 мг/л или 0.013 ммоль/л, что в 20 раз меньше концентрации, использованной в нашем исследовании (40 мг/л или 0.25 ммоль/л). Тем не менее обзор токсикологических исследований показал хорошую переносимость метформина при однократном приеме высоких доз. Не было выявлено ни одного случая передозировки метформина со смертельным исходом, если концентрация препарата в плазме не превышала 50 мг/л [21]. Кроме того, в клиническом исследовании, проведенном Simon R. Lord и соавт., было показано, что метформин в терапевтических концентрациях угнетает окислительное фосфорилирование и ингибирует путь mTOR в злокачественных опухолях молочной железы [22]. Это позволяет полагать, что метформин будет оказывать радиосенсibilизирующее влияние на ОСК и в терапевтических дозах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют заключить, что ОСК маммосфер линии MCF-7 обладают более высокой радиочувствительностью к γ, n -облучению, чем к γ -облучению, что позволяет ожидать более высокую эффективность нейтронной лучевой терапии в отношении элиминации ОСК. Перспективным радиосенсibilизатором, эффективным в отношении ОСК, является противодиабетический препарат метформин, так как показано, что он повышает радиочувствительность не только клеток маммосфер линии MCF-7, но и, в большей мере, ОСК маммосфер, как к γ -, так и γ, n -облучению.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность научным сотрудникам Курчатовского ядерно-физического комплекса А.Н. Стрепетову и Ю.Н. Панину за проведение облучения клеточных образцов на реакторе "ИР-8".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang F, Xu J., Tang L., Guan X. Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications // *Cell. Mol. Life Sci.* 2017. V. 74. № 6. P. 951–966. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2334-7>
2. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 7. P. 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
3. Li F., Tiede B., Massagué J. et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis // *Cell Res.* 2007. V. 17. № 1. P. 3–14. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310118>
4. Lee S.Y., Jeong E.K., Ju M.K. et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation // *Mol. Cancer.* 2017. V. 16. № 1. P. 10. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0577-4>
5. Матчук О.Н., Замулаева И.А., Селиванова Е.И. и др. Чувствительность клеток SP линии меланомы B16 к действию редко- и плотноионизирующего излучений // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2012. Т. 52. № 3. С. 261–267. [Matchuk O.N., Zamulaeva I.A., Selivanova E.I. et al. Sensitivity of melanoma B16 side population to low- and high-LET radiation // *Radiat. Biol. Radioecol.* 2012. V. 52. № 3. P. 261–267. (In Russ.)]
6. Storozhuk Y., Hopmans S.N., Sanli T. et al. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK // *Br. J. Cancer.* 2013. V. 108. № 10. P. 2021–2032. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.187>
7. Hirsch H.A., Iliopoulos D., Tschlis P.N. et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission // *Cancer Res.* 2009. V. 69. № 19. P. 7507–7511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2994>
8. Kalender A., Selvaraj A., Kim S.Y. et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner // *Cell Metab.* 2010. V. 11. № 5. P. 390–401. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.014>
9. Pollack M.N. Insulin, insulin-like growth factors, insulin resistance, and neoplasia // *Am. J. Clin. Nutr.* 2007. V. 86. № 3. P. s820–822. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.3.820S>
10. Арзуманов С.С., Сафронов В.В., Стрепетов А.Н. Определение поглощенной в биологическом образце дозы при смешанном гамма-нейтронном облучении // *Журн. техн. физики.* 2018. Т. 8. № 10. С. 1581–1584. [Arzumanov S.S., Safronov V.V., Strepetov A. Opredelenie pogloshhennoj v biologicheskom obrazce dozy pri smeshannom gamma-nejtronnom obluchenii // *Zhurnal tehnicheckoj fiziki.* 2018. V. 8. № 10. P. 1581–1584. (In Russ.)]
11. Шуватова В.Г., Кувырченкова А.П., Сёмочкина Ю.П., Москалёва Е.Ю. Радиосенсibilизация опухолевых стволовых клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 с помощью никло-

- замида // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2017. Т. 62. № 6. С. 5–11. [Shuvatova V.G., Kuvyrchenkova A.P., Sjomochkina Yu.P., Moskaljova E. Yu. Radiosensibilizacija opuholevyh stvolovyh kletok adenokarcinomy molochnoj zhelezy cheloveka linii MCF-7 s pomoshh'ju niklozamida // Medicinskaja radiologija i radiacionnaja bezopasnost'. 2017. V. 62. № 6. P. 5–11. (In Russ.)]
12. Cho Y.M., Kim Y.S., Kang M.J. et al. Long-term recovery of irradiated prostate cancer increases cancer stem cells // *Prostate*. 2012. V. 72. № 16. P. 1746–1756. <https://doi.org/10.1002/pros.22527>
 13. Gomez-Casal R., Bhattacharya C., Ganesh N. et al. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes // *Mol. Cancer*. 2013. V. 12. № 1. P. 94. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-94>
 14. Lagadec C., Vlashi E., Della Donna L. et al. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells // *Stem. Cells*. 2012. V. 30. № 5. P. 833–844. <https://doi.org/10.1002/stem.1058>
 15. Pickup M., Novitskiy S., Moses H.L. The roles of TGF β in the tumour microenvironment // *Nat. Rev. Cancer*. 2013. V. 13. № 11. P. 788–799. <https://doi.org/10.1038/nrc3603>
 16. Kim E.H., Kim M.S., Cho C.K. et al. Low and high linear energy transfer radiation sensitization of HCC cells by metformin // *J. Radiat. Res.* 2014. V. 55. № 3. P. 432–442. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrt131>
 17. Liu J., Hou M., Yuan T. et al. Enhanced cytotoxic effect of low doses of metformin combined with ionizing radiation on hepatoma cells via ATP deprivation and inhibition of DNA repair // *Oncol. Rep.* 2012. V. 28. № 4. P. 1406–1412. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1932>
 18. Zhang T., Zhang L., Zhang T. et al. Metformin sensitizes prostate cancer cells to radiation through EGFR/p-DNA-PKCS in vitro and in vivo // *Radiat. Res.* 2014. V. 181. № 6. P. 641–649. <https://doi.org/10.1667/RR13561.1>
 19. Junttila M.R., de Sauvage F.J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response // *Nature*. 2013. V. 501. № 7467. P. 346–354. <https://doi.org/10.1038/nature12626>
 20. Zannella V.E., Dal Pra A., Muaddi H. et al. Reprogramming metabolism with metformin improves tumor oxygenation and radiotherapy response // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 24. P. 6741–6750. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1787>
 21. Dell'Aglio D.M., Perino L.J., Kazzi Z. et al. Acute metformin overdose: examining serum pH, lactate level, and metformin concentrations in survivors versus non-survivors: a systematic review of the literature // *Ann. Emerg. Med.* 2009. V. 54. № 6. P. 818–823. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2009.04.023>
 22. Lord S.R., Cheng W.C., Liu D. et al. Integrated Pharmacodynamic Analysis Identifies Two Metabolic Adaptation Pathways to Metformin in Breast Cancer // *Cell Metab.* 2018. V. 28. № 5. P. 679–688. e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.021>

Increasing the Radiosensitivity of MCF-7 Cancer Stem Cells Cultivated as Mammospheres to γ - and γ -neutron Irradiation with Metformin

V. G. Shuvatova^{a, #}, A. P. Kuvyrchenkova^a, Yu. P. Semochkina^a, and E. Yu. Moskaleva^a

^aNational Research Center Kurchatov Institute, Moscow, Russia

[#]E-mail: Shuvatova_VG@nrcki.ru

Cancer stem cells (CSCs) are highly resistant to chemo- and radiotherapy. The aim of the work was to study the effect of metformin on the radiosensitivity of MCF-7 cells cultivated as mammospheres enriched with CSCs. One hour after the addition of metformin at a non-toxic concentration of 0.25 mmol/l, cells of mammospheres were exposed to γ -radiation at a dose of 2 Gy or reactor γ ,n-radiation at a dose of 1 Gy. After 24 hours of cultivation, the drug was removed. Six days after irradiation, the total number of cells was calculated by haemocytometer, then the percentage of CSCs with the CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype was determined, and the number of CSCs in the samples was calculated. The exposure to γ ,n-radiation led to a significant decrease in both the total number of cells and CSCs compared with γ -radiation. The combined exposure to metformin and γ - or γ ,n-radiation led to significant decrease in both the total number of cells and CSCs compared with the exposure to γ - or γ ,n-radiation only ($p < 0.05$). Thus, γ ,n-radiation is more effective in respect to eliminating the MCF-7 CSCs than the γ -radiation. Metformin increases the sensitivity of the MCF-7 CSCs to γ - and γ ,n-radiation.

Keywords: cancer stem cells, breast adenocarcinoma, MCF-7 line, mammospheres, metformin, γ -radiation, γ ,n-radiation, radioresistance, radiosensitization