

DOI 10.12737/article_5a251c065ed543.22688556

В.Г. Шуватова, А.П. Кувырченкова, Ю.П. Семочкина, Е.Ю. Москалёва
РАДИОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ MCF-7 С ПОМОЩЬЮ НИКЛОЗАМИДА

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва. E-mail: shuvatova.vg@gmail.com

В.Г. Шуватова – инженер-исследователь; А.П. Кувырченкова – лаборант-исследователь; Ю.П. Семочкина – лаборант-исследователь; Е.Ю. Москалёва – в.н.с., д.б.н., проф.

Реферат

Цель: Изучить влияние никлозамида на радиочувствительность опухолевых стволовых клеток (ОСК) аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 и исследовать механизм его радиосенсибилизирующего действия.

Материал и методы: 3D-культуру маммофер линии MCF-7 получали при культивировании прикрепляющихся клеток 2D-культуры в низкоадгезивных условиях в среде, содержащей EGF, bFGF, добавку B27, гепарин и инсулин. Через 7 и 14 сут после гамма-облучения клеток 2D- и 3D-культур в виде суспензии в дозах 1, 2, 4, 6 и 8 Гр (^{60}Co) исследовали размер фракции ОСК с фенотипом $\text{CD44}^+/\text{CD24}^{\text{low}}$ с помощью проточной цитометрии. Влияние никлозамида на радиочувствительность клеток 2D- и 3D-культур оценивали с помощью подсчета их количества в камере Горяева через 7 и 14 сут после облучения в дозах 2 или 4 Гр. Никлозамид добавляли к клеткам за 1 ч до облучения в концентрации 2 мкМ. Через 7 сут после совместного действия облучения и никлозамида исследовали размер фракции ОСК. Через 1 ч после облучения определяли уровень гистона γH2AX с помощью проточной цитометрии.

Результаты: Культивирование клеток линии MCF-7 в виде маммофер приводит к увеличению содержания ОСК: доля ОСК в 2D-культуре составила $0,2 \pm 0,1\%$, а в 3D-культуре – $3,2 \pm 0,6\%$. При облучении размер фракции ОСК увеличивался пропорционально дозе. Через 14 сут после облучения в дозе 8 Гр он достиг $2,2 \pm 0,6\%$ в 2D-культуре и $12,0 \pm 0,9\%$ в 3D-культуре. Обнаружена более высокая радиоустойчивость клеток линии MCF-7, культивируемых в виде маммофер. Через 7 и 14 сут после облучения в дозе 2 Гр количество клеток 2D-культуры снижалось до $58 \pm 4\%$ и $43 \pm 7\%$, а клеток 3D-культуры – до $92 \pm 13\%$ и $66 \pm 11\%$ соответственно по сравнению с контролем. Через 7 и 14 сут после облучения клеток в дозах 2 и 4 Гр при их инкубации с никлозамидом обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение количества клеток по сравнению с их количеством после облучения в соответствующих дозах без добавления никлозамида. Через 7 сут после облучения в дозах 2 и 4 Гр доля ОСК в культуре маммофер составила $6,0 \pm 0,6\%$ и $3,0 \pm 0,8\%$, а после инкубации с никлозамидом и облучения – $4,0 \pm 0,1\%$ и $2,5 \pm 0,3\%$ соответственно. В клетках 3D-культуры уровень гистона γH2AX через 1 ч после облучения в дозах 2 и 4 Гр увеличился в 2,4 и 4,8 раз относительно исходного уровня, а после совместного действия никлозамида и облучения в этих же дозах – в 3,4 и 5,5 раз, что свидетельствует об увеличении двуниевых разрывов ДНК в этих условиях.

Выводы: Никлозамид обладает радиосенсибилизирующим действием в отношении ОСК аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, культивируемых в виде 2D и 3D-культур, увеличивая уровень пострadiационных повреждений ДНК.

Ключевые слова: никлозамид, γ -излучение, линия MCF-7, опухолевые стволовые клетки, аденокарцинома молочной железы человека, радиоустойчивость, радиосенсибилизация

Поступила: 29.11.2016. Принята к публикации: 09.11.2017

Введение

Современные представления о механизме канцерогенеза связаны с признанием существования опухолевых стволовых клеток (ОСК) – клеток, которым принадлежит ключевая роль в инициации и развитии опухолевого процесса [1]. В солидных опухолях ОСК впервые были обнаружены М. Al-Hajj и соавторами, которые показали, что только небольшая популяция клеток с фенотипом $\text{CD44}^+\text{CD24}^{\text{low}}\text{ESA}^+$ (ESA – epithelial-specific antigen – специфический для эпителиальных клеток антиген) способна индуцировать развитие опухолей при их трансплантации иммунодефицитным мышам [2]. Впоследствии были накоплены убедительные доказательства присутствия ОСК в различных типах солидных опухолей человека [3].

ОСК обладают устойчивостью к действию повреждающих факторов. Они характеризуются высокой резистентностью к химиотерапевтическим препаратам, благодаря высокому уровню экспрессии генов ABC-транспортеров ABCG2, ABCB1 и ABCC1, которые обеспечивают выброс цитотоксических лекарств из клеток [4].

ОСК также обладают устойчивостью к действию ионизирующего излучения, благодаря высокой активности систем репарации ДНК, высокому уровню антиоксидантов, повышенной экспрессии генов, обеспечивающих биосинтез глутатиона, и высокому уровню

антиапоптотических белков. Помимо указанных биохимических особенностей, радиоустойчивость ОСК определяется их локализацией в опухоли. Известно, что в опухоли ОСК занимают определенные ниши и особенно часто встречаются в гипоксических зонах. В этих условиях опухолевые клетки синтезируют индуцируемый гипоксией фактор (HIF – hypoxia-inducible factor), который активирует транскрипцию генов, кодирующих белки сигнальных путей Notch, Wnt и Hedgehog. Эти пути играют важную роль в регуляции пролиферации ОСК. Их активация приводит к ускоренной репопуляции ОСК во время или после лучевой терапии [5].

Несмотря на несомненные успехи современной радио- и химиотерапии в лечении онкологических заболеваний, у многих пациентов случаются рецидивы заболевания или развиваются отдаленные метастазы. Риск рецидивирования онкологического заболевания после лечения во многом зависит от сохранения ОСК, резистентных к химическому, лучевому или комбинированному воздействию [5].

Результаты исследований, выполненных *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют о том, что ОСК обладают устойчивостью и к фракционированному облучению. Известно несколько механизмов такой устойчивости, включая повышенную способность к репарации сублетальных повреждений в промежутках между сеансами облучения [6]. Показано, что фракционированное

облучение приводит к увеличению относительного и абсолютного количества ОСК, которые способны восстанавливать основную популяцию клеток, благодаря способности ОСК к пролиферации и дифференцировке в обычные опухолевые клетки, не обладающие свойствами стволовых. Так, обнаружено увеличение доли клеток с фенотипом CD133⁺, характерным для ОСК, после фракционированного облучения (5×3 Гр) ксенотрансплантатов глиомы *in vivo* и увеличение ОСК карциномы молочной железы линии T-47D и аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 после фракционированного облучения (4×3 Гр и 5×3 Гр) [7]. Обнаружено, что фракционированное облучение усиливает пролиферацию ОСК, индуцируя их выход из фазы G₀ и переход в стадию пролиферации [8]. Показано, что в опухолях некоторых типов количество ОСК коррелирует с клиническим исходом лучевой терапии [9].

Для преодоления высокой устойчивости ОСК к действию излучения необходим поиск новых способов лучевой терапии, в том числе с использованием радиосенсибилизаторов [10].

Результаты исследований, выполненных в последние годы, свидетельствуют о том, что ОСК особенно чувствительны к повреждению митохондрий [11]. Высокая активность в отношении ОСК обнаружена у хорошо известного и давно используемого в практике противогельминтного препарата никлозамида, механизм действия которого связан с повреждением митохондрий и снижением образования АТФ путем окислительного фосфорилирования. Было показано, что он может повышать чувствительность к облучению клеток рака легкого, культивируемых *in vitro* [12].

Целью настоящей работы явилось изучение способности никлозамида сенсибилизировать ОСК аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 к действию γ -излучения, оцениваемой по его влиянию на количество клеток и образование двуниевых разрывов (ДР) ДНК, определяемых по уровню гистона γ H2AX.

Известно, что содержание ОСК в культуре клеток линии MCF-7 невелико, но может быть увеличено при их культивировании в специально разработанных условиях в суспензионной культуре в виде сфероидов – маммосфер. Поэтому в работе использовали два способа культивирования клеток: в виде 2D-культуры – культуры прикрепляющихся к пластиковой подложке клеток и в виде суспензионной 3D-культуры маммосфер.

Материал и методы

Культивирование клеток

Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 (2D-культура) культивировали в среде DMEM (Gibco, США), с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина (HyClone, США) в CO₂-инкубаторе при 37 °С в увлажненной атмосфере (95 %), содержащей 5 % CO₂.

Культуру маммосфер в соответствии с протоколом получали из клеток 2D-культуры согласно работе [13] с некоторыми модификациями. После достижения 80 %-й конfluenceности клетки 2D-культуры линии MCF-7 снимали с подложки с помощью 0,05 % раствора трипсина в растворе Версена и помещали в низкоадгезивные культуральные чашки в концентрации 20 клеток/мкл в среде DMEM/F12 без фенолового красного (Gibco, США), содержащей 20 нг/мл EGF (Calbiochem, Германия), 10 нг/мл bFGF (PeproTech, США), 2 % специальной добавки B27 (Gibco, США), 10 мкг/мл инсулина (Calbiochem, Германия), 4 мкг/мл гепарина (Serva, Германия), 50 мкг/мл гентамицина (HyClone, США). Через 5–7 сут культивирования формировались маммосферы диаметром 100–150 нм. Их собирали при помощи центрифугирования (100g, 5 мин) и диссоциировали раствором аккутазы (Sigma-Aldrich, Германия) на отдельные клетки, которые культивировали в указанных условиях.

Подсчет количества клеток

Клетки 2D-культуры снимали с подложки с помощью 0,05 % раствора трипсина в растворе Версена, а маммосферы диссоциировали с помощью раствора аккутазы. Клетки суспендировали в культуральной среде и количество живых клеток 2D- и 3D-культур подсчитывали в камере Горяева с использованием трипанового синего для исключения мертвых клеток.

Облучение клеток

Клетки 2D- и 3D-культур облучали в виде суспензии в 2 мл бессывороточной среды DMEM или среды DMEM/F12 без факторов и добавок соответственно в концентрации 45 тыс. клеток/мл в дозах 1, 2, 4, 6 и 8 Гр на установке ГУТ-200М (источник γ -излучения ⁶⁰Co, мощность дозы 0,54 Гр/мин). После облучения клетки переносили в соответствующую полную среду и культивировали в стандартных условиях в течение 7 или 14 сут, после чего проводили подсчет клеток и определяли размер фракции ОСК.

Анализ количества клеток 2D- и 3D-культуры при совместном действии γ -излучения и никлозамида

Влияние совместного действия γ -излучения и никлозамида на количество клеток 2D и 3D-культур оценивали через 7 и 14 сут после облучения. За 1 ч до облучения клетки диссоциировали, к части образцов добавляли никлозамид в концентрации 2 мкМ, затем клетки с никлозамидом и без него облучали в дозах 2 и 4 Гр, после чего суспензию клеток помещали в 6-луночные планшеты (низкоадгезивные для 3D-культуры) по 44 тыс. клеток в лунку в соответствующей полной культуральной среде, содержащей 2 мкМ никлозамида. Через 24 ч после облучения среду, содержащую никлозамид, заменяли на среду без этого препарата. Контрольные и облученные маммосферы рассеивали в концентрации 20 клеток/мкл 1 раз в 7 сут. Прикрепляющиеся клетки пересевали 1 раз в 7 сут, так как исходно их специально высаживали в низкой

плотности. При этом необлученный контроль – необлученные образцы с добавлением никлозамида – рассевали в соотношении 1 : 3, а клетки, облученные в дозе 2 Гр и 2 Гр с добавлением никлозамида, – в соотношении 1 : 2. Указанные условия использованы для того, чтобы после пересева клетки во всех культурах были в одинаковой плотности. Клетки, облученные в дозах 4, 6, 8 Гр и 4 Гр с добавлением никлозамида, не рассевали, так как они росли медленно. Через 7 и 14 сут после облучения количество живых клеток подсчитывали в камере Горяева с использованием трипанового синего для выявления погибших клеток. После подсчета количества клеток в контрольных необлученных культурах (0 Гр) через 14 сут культивирования рассчитывали общее количество клеток, которое должно было вырасти в культуре с учетом разведения при пересеве. Аналогичным образом определяли общее количество клеток в необлученных образцах с добавлением никлозамида, а также в культурах, облученных в дозе 2 Гр и 2 Гр с добавлением никлозамида. Подсчитанное количество клеток в контрольных необлученных культурах (0 Гр) через 7 и 14 сут культивирования было принято за 100 % для соответствующих временных точек при культивировании клеток после разных воздействий. Проведено 2 эксперимента.

Определение фракции опухолевых стволовых клеток

Фенотипирование клеток 2D- и 3D- культур по антигенам CD24 и CD44 проводили в соответствии с [14]. Клетки диссоциировали как описано выше, собирали с помощью центрифугирования, осадок клеток промывали холодным буфером для окрашивания, состоящим из фосфатно-солевого буфера, 0,1 % азида натрия (Merck, Германия) и 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (ДИА-М, Россия) и ресуспендировали в том же буфере. К 50 мкл суспензии клеток добавляли по 2,5 мкл антител к CD24, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), и антител к CD44, меченных фикоэритрином (PE, оба антитела Biolegend, США). Клетки инкубировали с антителами в темноте, при +4 °C в течение 45 мин, затем трижды промывали холодным буфером для окрашивания и определяли долю клеток с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low}, анализируя суспензию клеток на цитофлуориметре FACS Calibur (BD Bioscience, США, ресурсный центр молекулярной и клеточной биологии).

Анализ содержания гистона γ H2AX с помощью проточной цитофлуориметрии

После облучения в дозах 2 и 4 Гр с добавлением и без добавления никлозамида клетки 2D- и 3D- культур инкубировали в культуральной среде в течение 1 ч при 37 °C, затем проводили анализ, как описано в [15] с некоторыми модификациями. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 3 % ФБС и фиксировали в абсолютном метаноле при +4 °C в течение 20 мин, образцы хранили в метаноле при –20 °C до проведения измерений. Перед исследованием клетки отмывали от метанола в растворе для блокировки

(ФСБ, содержащий 3 % ФБС и 0,05 % Твин-20; pH 7,4) и инкубировали в этом растворе с прямыми мышинными моноклональными антителами к гистону γ H2AX, меченными Alexa Fluor 488 (BD Pharmingen, США; разведение 1:100). Для измерения использовали не менее 100 тыс. клеток на пробу в виде суспензии в ФСБ. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием программы OriginPro 8.1. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Размер фракции ОСК – клеток с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low} – в 2D- и 3D-культурах анализировали в контрольных и облученных клетках через 7 и 14 сут после действия γ -излучения. Полученные результаты представлены на рис. 1. На рис.1А показан пример результатов анализа субпопуляции CD44⁺/CD24^{-low} методом проточной цитофлуориметрии. В 2D-культурах контрольных клеток фракция ОСК составила в среднем $0,2 \pm 0,1$ % от общей популяции, а в 3D-культурах – $3,2 \pm 0,6$ %. Таким образом, содержание ОСК в 3D-культурах линии MCF-7 было в среднем в 16 раз выше, чем в 2D-культурах.

Из данных, представленных на рис. 1Б и 1В, следует, что облучение приводит к зависящему от дозы и времени после воздействия увеличению фракции ОСК в культуре клеток линии MCF-7. Так, в 2D-культуре при дозе 8 Гр, а в 3D-культуре, начиная с дозы 2 Гр, обнаружено увеличение доли этих клеток через 7 сут после воздействия. Через 14 сут после облучения размер фракции клеток CD44⁺/CD24^{-low} увеличивался как в 2D-, так и в 3D-культурах клеток пропорционально дозе, начиная с дозы 4 Гр. Через 7 сут после облучения в дозе 8 Гр доля ОСК в 2D-культуре составила $1,5 \pm 0,2$ %, а в 3D-культуре – $6,0 \pm 0,4$ %, а на 14 сут – соответственно $2,2 \pm 0,6$ и $12,0 \pm 0,9$ %. Подчеркнем, что при длительном культивировании общее количество контрольных клеток и клеток после различных воздействий подсчитывали с учетом их разведения при пересеве, как описано в разделе «Материал и методы». Полученные результаты соответствуют представлениям о высокой устойчивости ОСК к действию γ -излучения, которая, как известно, в значительной мере определяется высоким уровнем репарации ДНК в этих клетках [16].

В следующей серии экспериментов было изучено влияние облучения, никлозамида и совместного действия этих факторов на количество клеток линии MCF-7, культивируемых в виде 2D- и 3D-культур. Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о более высокой устойчивости клеток 3D-культуры к действию облучения. Облучение в дозах 2 и 4 Гр приводило к снижению количества клеток 2D-культуры

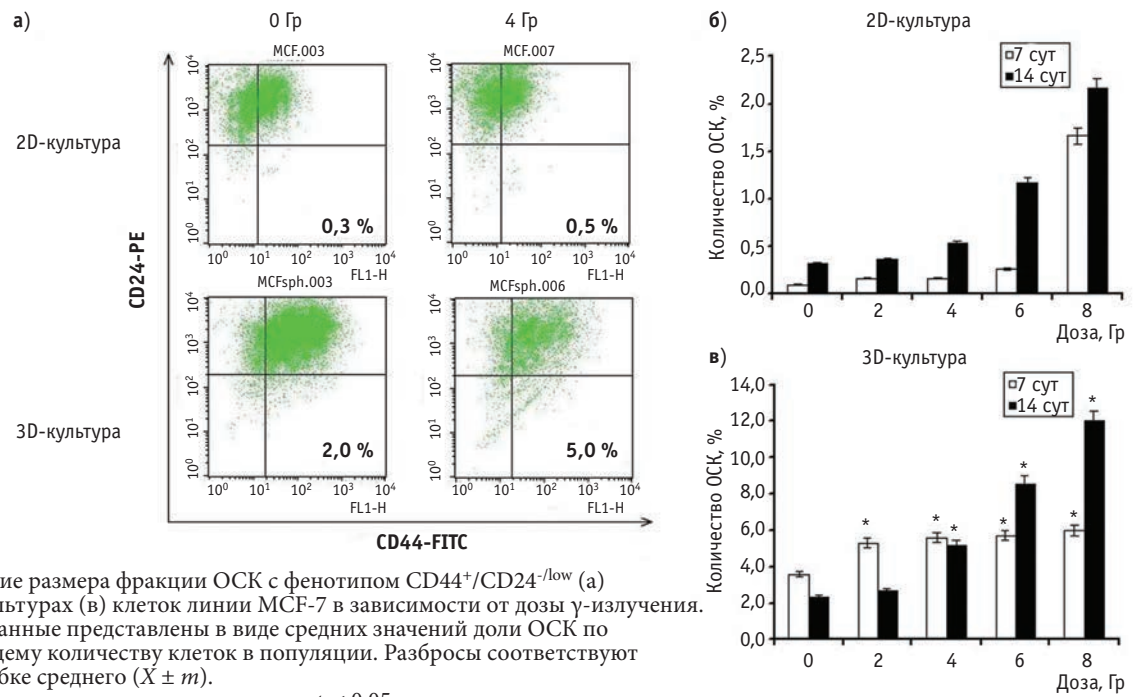


Рис. 1. Определение размера фракции ОСК с фенотипом CD44⁺/CD24^{-/low} (а) в 2D- (б) и 3D-культурах (в) клеток линии МСF-7 в зависимости от дозы γ -излучения. На рис. (б) и (в) данные представлены в виде средних значений доли ОСК по отношению к общему количеству клеток в популяции. Разбросы соответствуют стандартной ошибке среднего ($X \pm m$).

* Отличия от контроля статистически значимы, $p < 0,05$

по сравнению с необлученным контролем до 58 ± 4 и 37 ± 3 % через 7 сут и до 43 ± 7 и 7 ± 2 % через 14 сут после облучения соответственно. При облучении клеток 3D-культуры в дозах 2 и 4 Гр уменьшение их количества было менее выраженным. Через 7 сут после облучения в дозах 2 и 4 Гр количество клеток, культивируемых в виде маммосфер, составило 92 ± 13 и

61 ± 10 % по сравнению с необлученным контролем, а через 14 сут – 66 ± 11 и 30 ± 7 % соответственно.

Показано (рис. 2а, б), что никлозамид в субтоксичной концентрации сенсibilизировал клетки и 2D- и 3D-культур к действию γ -излучения. Установлено, что через 7 сут после предварительной обработки клеток никлозамидом и облучения в дозах 2 и 4 Гр происходило снижение количества клеток 2D- и 3D-культур по сравнению с количеством клеток после облучения в соответствующих дозах без добавления никлозамида (рис. 2а). При совместном действии никлозамида и облучения в дозах 2 и 4 Гр количество выживших клеток 2D-культуры снижалось на 11 и 29 %, а клеток 3D-культуры – на 15 и 8 % соответственно, по сравнению с действием только облучения без добавления никлозамида. Через 14 сут после облучения наблюдали статистически значимое снижение количества клеток при их инкубации с никлозамидом только для 3D-культуры по сравнению с количеством клеток после облучения без предварительного добавления никлозамида (рис. 2б). Так, после инкубации с никлозамидом и облучения в дозах 2 и 4 Гр количество клеток 3D-культуры снижалось на 12 и 9 % соответственно по сравнению с действием только облучения в соответствующих дозах без добавления никлозамида.

На рис. 3 представлены результаты анализа размера фракции ОСК через 7 сут после облучения. Доля клеток с фенотипом CD44⁺/CD24^{-/low} в контрольной 3D-культуре составила $3,1 \pm 0,5$ %, после действия облучения в дозах 2 и 4 Гр – $4,6 \pm 0,3$ и $6,1 \pm 0,5$ %, а после инкубации с никлозамидом и облучения – $2,5 \pm 0,1$ и $4,0 \pm 0,3$ % соответственно. Таким образом, через 7 сут после обработки клеток никлозамидом и облучения в дозах 2 и 4 Гр происходит статистически значимое уменьшение доли ОСК в 3D-культуре по сравнению с

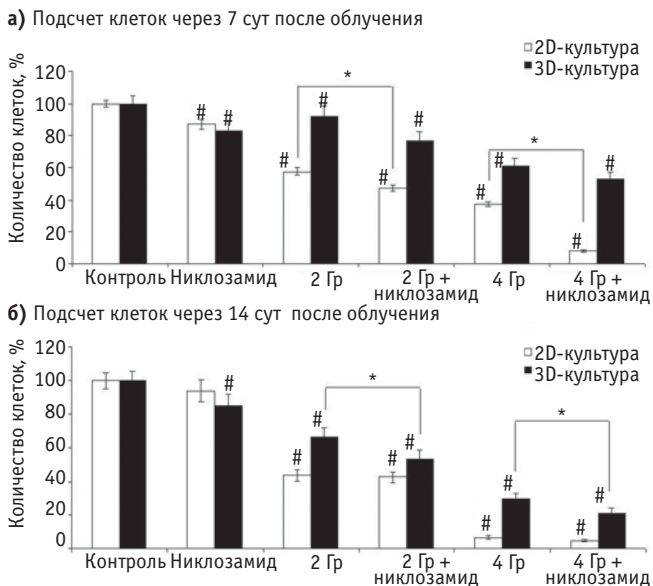


Рис. 2. Влияние совместного действия никлозамида и облучения на количество клеток линии МСF-7, культивируемых в виде 2D- и 3D-культур, через 7 (а) и 14 (б) сут после облучения. Количество клеток в контрольных культурах принято за 100 %, разбросы соответствуют стандартной ошибке среднего ($X \pm m$).

* Отличия между группами статистически значимы, $p < 0,05$.
 # Отличия от контроля статистически значимы, $p < 0,05$

действием только облучения в соответствующих дозах без добавления никлозамида (рис. 3). Статистически значимого изменения доли ОСК в 2D-культуре при совместном действии никлозамида и γ -излучения не наблюдали. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой эффективности совместного действия никлозамида и γ -излучения, особенно в отношении ОСК линии MCF-7, культивируемых в виде маммофер. Обнаруженное влияние никлозамида преимущественно на чувствительность клеток 3D-культуры к действию γ -излучения может быть связано как с ингибированием этим препаратом важных для ОСК сигнальных каскадов Wnt, Notch и Hedgehog, так и с повреждением митохондрий, к которому особенно чувствительны ОСК [17].

Известно, что действие γ -излучения на клетки связано, в первую очередь, с повреждением молекулы ДНК. При изучении механизма действия никлозамида было показано, что он снижает мембранный потенциал митохондрий и индуцирует образование активных форм кислорода, которые также могут вносить вклад в повреждение ДНК [18]. Поэтому далее было исследовано влияние совместного действия никлозамида и облучения на образование ДР ДНК в клетках 3D-культуры через 1 ч после облучения в дозах 2 и 4 Гр. Для определения уровня образования ДР ДНК использовали иммуноцитохимический метод определения гистона γ H2AX в клетках с помощью проточной цитометрии.

Полученные результаты представлены на рис. 4а, б. Показано, что в клетках 3D-культуры уровень гистона γ -H2AX через 1 ч после облучения в дозе 2 Гр увеличился в 2,4 раза относительно исходного уровня, а после совместного действия никлозамида и облучения в этой же дозе – в 3,4 раза. Через 1 ч после облучения в дозе 4 Гр уровень гистона γ H2AX увеличился в 4,8 раз, а после совместного действия никлозамида и γ -излучения – в 5,5 раз (рис. 4б). При действии никлозамида уровень гистона γ H2AX возрастал в 1,2 раза.

Представленные данные свидетельствует о том, что предварительная обработка клеток никлозамидом повышала уровень ДР ДНК, индуцируемых действием γ -излучения, до более высоких значений, чем при раздельном использовании каждого из этих факторов. Полученные результаты показывают, что никлозамид оказывает радиосенсибилизирующее действие в отношении ОСК аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, культивируемых в виде 3D-культуры, увеличивая уровень повреждения ДНК.

Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет заключить, что клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, культивируемые в виде 3D-культуры, характеризуются более высокой резистентностью к действию облучения в дозах 2 и 4 Гр. В 3D-культуре линии MCF-7 содержание фракции клеток с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low}, т.е. ОСК, было в 16 раз выше, чем в 2D-культуре. Облучение клеток в дозе 2 Гр – дозе, при-

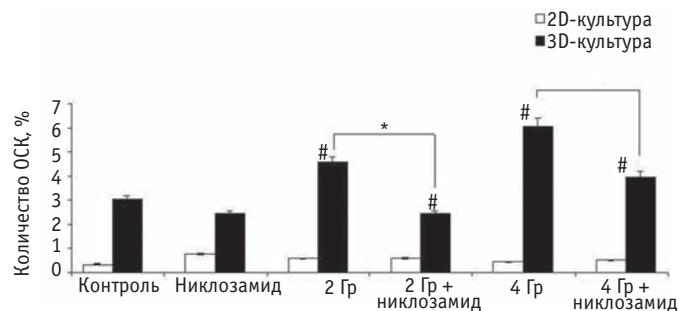


Рис. 3. Влияние γ -излучения и никлозамида на размер фракции ОСК в популяции клеток линии MCF-7, культивируемых в виде 2D- и 3D-культур, через 7 сут после облучения. Указаны средние значения количества клеток с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low} в процентах от необлученного контроля, разбросы соответствуют стандартной ошибке среднего ($X \pm m$).

* Отличия между группами статистически значимы, $p < 0,05$.
Отличия от контроля статистически значимы, $p < 0,05$

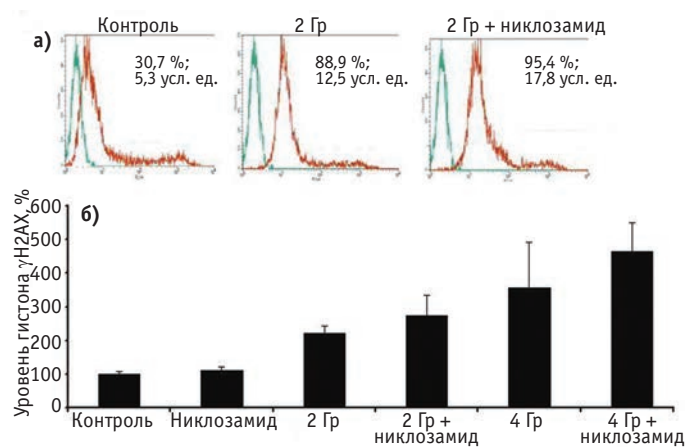


Рис. 4. Уровень гистона γ H2AX в клетках 3D-культуры линии MCF-7 через 1 ч после облучения без и в присутствии никлозамида.

а) Гистограммы аутофлуоресценции (левый пик) и флуоресценции клеток, окрашенных антителами к гистону γ H2AX (правый пик). Цифрами указана доля окрашенных клеток в процентах и средняя интенсивность флуоресценции (MFI) окрашенных клеток в условных единицах (усл. ед.).
б) Относительный уровень гистона γ H2AX после действия никлозамида и γ -излучения. За 100 % принято значение MFI в контроле, разбросы соответствуют стандартной ошибке среднего ($X \pm m$)

нятой для однократного облучения при фракционированном облучении при лучевой терапии, – приводило лишь к незначительному снижению количества клеток маммофер. Фракция ОСК после облучения увеличивалась с увеличением дозы излучения. Обнаружена более высокая чувствительность клеток 3D-культуры по сравнению с клетками 2D-культуры к радиосенсибилизирующему действию никлозамида. При этом обнаружено повышение радиочувствительности высоко резистентной субпопуляции ОСК с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low}.

Представленные результаты позволяют рассматривать никлозамид как перспективный для клиники радиосенсибилизатор. Механизм радиосенсибилизирующего действия никлозамида, как мы показали, связан с его способностью увеличивать количество ДР ДНК при совместном действии с облучением.

Выводы

1. При культивировании клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 в виде 3D-культуры маммосфер обнаружено более высокое содержание фракции ОСК с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low}, чем при их культивировании в виде 2D-культуры прикрепляющихся клеток.

2. Обнаружена высокая устойчивость клеток с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low} в 2D- и 3D-культурах клеток линии MCF-7 к действию γ -излучения.

3. Показано, что никлозамид обладает радиосенсибилизирующим действием в отношении клеток линии MCF-7, культивируемых в виде маммосфер и в виде прикрепляющихся клеток.

4. Обнаружено повышение количества ДР ДНК, оцениваемое по уровню гистона γ H2AX, в клетках маммосфер при совместном действии никлозамида и γ -излучения, что может определять его радиосенсибилизирующее действие в отношении этих клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li F, Tiede B, Massagué J. et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis // *Cell Research*. 2007. Vol. 17. P. 3–14.
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. Vol. 100. № 7. P. 3983–3988.
3. Visvader J.E., Lindeman G.J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions // *Nat. Rev. Cancer*. 2008. Vol. 8. № 10. P. 755–768.
4. Choi C.H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal // *Cancer Cell Int*. 2005. Vol. 5. P. 30–38.
5. Krause M., Dubrovska A., Linde A. et al. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2017. Vol. 109. P. 63–73.
6. Krause M., Yaromina A., Eicheler W. et al. Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy // *Clin. Cancer Res*. 2011. Vol. 17. № 23. P. 7224–7229.
7. Bao S., Wu Q., McLendon R.E. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // *Nature*. 2006. Vol. 444. P. 756–760.
8. Lagadec C., Vlashi E., Donna L.D. et al. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment // *Breast Cancer Res*. 2010. Vol. 12. №1. P. R13–R20.
9. Peitzsch C., Kurth I., Kunz-Schughart L. et al. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance // *Radiother. Oncol*. 2013. Vol. 108. P. 378–387.
10. Yang T., Rycak K. Targeted therapy against cancer stem cells // *Oncol. Lett.*, 2015. Vol. 10. № 1. P. 27–33.
11. Lamb R., Harrison H., Hulit J. et al. Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition // *Oncotarget*. 2014. Vol. 5. № 22. P. 11029–11037.
12. You S., Li R, Park D. Disruption of STAT3 by Niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer // *Mol. Cancer Ther*. 2014. Vol. 13. № 3. P. 606–616.
13. Dontu G., Abdallah W.M., Foley J.M. et al. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells // *Genes Dev*. 2003. Vol. 17. № 10. P. 1253–1270.
14. Wang R., Lv Q., Meng W. et al. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors // *J. Thorac. Dis*. 2014. Vol. 6. № 6. P. 829–837.
15. Krutzik P., Nolan G. Intracellular phosphoprotein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events // *Cytometry. Part A*. 2003. Vol. 55A. P. 61–70.
16. Phillips T.M., McBride W.H., Pajonk F. The response of CD24^{-low}/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation // *J. Natl. Cancer Inst*. 2006. Vol. 98. № 24. P. 1777–1785.
17. Wang Y.C., Chao T.K., Chang C.C. et al. Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells // *PLoS One*. 2013. № 8. e74538.
18. Khanim F.L., Merrick B.A., Giles H.V. et al. Redeployment-based drug screening identifies the anti-helminthic niclosamide as anti-myeloma therapy that also reduces free light chain production // *Blood Cancer J*. 2011. Vol. 1. № 10. e39.

DOI 10.12737/article_5a251c065ed543.22688556

Radiosensitizing Effect of Niclosamide on Cancer Stem Cells of the Human Mammary Adenocarcinoma MCF-7 Cell Line

V.G. Shuvatova, A.P. Kuvyrchenkova, Yu.P. Semochkina, E.Yu. Moskaleva

National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia. E-mail: shuvatova.vg@gmail.com

V.G. Shuvatova – Research Engineer; A.P. Kuvyrchenkova – Research Assistant; Yu.P. Semochkina – Research Assistant; E.Yu. Moskaleva – Leading Researcher, Dr. Sc. Biol., Prof.

Abstract

Purpose: To investigate the effect of niclosamide on the radiosensitivity of MCF-7 cancer stem cells (CSC) and to explore the molecular mechanism of radiosensitization.

Material and methods: Cancer stem cells were obtained from MCF-7 mammary adenocarcinoma monolayer culture (2D) and propagated as mammospheres (3D) in serum-free DMEM/F12 supplemented with EGF, bFGF, B 27, heparin, and insulin in ultra-low attachment plates. The single cell suspensions were irradiated with 1, 2, 4, 6, and 8 Gy using ⁶⁰Co source at a dose rate of 0.54 Gy/min. Controls were sham irradiated. The size of the CD44⁺/CD24^{low} CSC fraction was measured using flow cytometry at the 7th and 14th days after irradiation. The radiosensitizing effect of niclosamide on the 2D- and 3D-cell cultures was assessed by the number of cells at the 7th and 14th days after irradiation with doses of 2 or 4 Gy. Niclosamide was added to the cell cultures in a dose of 2 μM 1 h before irradiation. Media with niclosamide were changed to corresponding media without niclosamide 24 h post-irradiation. Cell survival was evaluated by hemocytometer cell counting using trypan blue. The size of the CSC fraction was measured at the 7th day after the irradiation with or without niclosamide. To investigate the effect of niclosamide on DNA damage the level of histone γH2AX was measured by flow cytometry at 60 min after irradiation.

Results: Culturing adherent MCF-7 cells line under non-adherent mammosphere-forming conditions led to significantly increase in CSCs proportion. CD44⁺/CD24^{low} cell fraction in 2D-culture was 0.2 ± 0.1 %, and it was 3.2 ± 0.6 % in 3D-culture (the third-generation spheres). Subpopulation of CSCs increased with the increase in irradiation dose. At day 14 after irradiation with the dose of 8 Gy, CD44⁺/CD24^{low} cell fraction in 2D-culture was 2.2 ± 0.6 %, and it was 12.0 ± 0.9 % in 3D-culture. Cells grown in mammosphere-culture were found to have a higher survival rate after irradiation at doses of 2 and 4 Gy than cells grown in adherent conditions. At day 7 after irradiation with 2 and 4 Gy the 3D-culture cells count decreased less than the 2D-culture cells counts (92 ± 13 % and 61 ± 10 % versus 58 ± 4 % and 37 ± 3 % compared to non-irradiated control). Moreover, cells grown in mammosphere-culture showed a higher renewal capacity. At day 14 after irradiation with 2 and 4 Gy the number of 3D-culture cells was 66 ± 11 % and 30 ± 7 % while the number of adherent cells was 43 ± 2 % and 7 ± 1 % compared to non-irradiated control. It was found that niclosamide has radiosensitizing effect on cells grown in mammospheres. Pretreatment with niclosamide 1 h prior to irradiation resulted in decrease in cell survival. At day 7 after irradiation at 2 and 4 Gy in the presence of niclosamide, the numbers of 3D-culture cells were reduced by 13 % and 7 % compared to their numbers after irradiation with appropriate doses in the absence of niclosamide. Furthermore, niclosamide was shown to reduce the percentage of CSCs. At day 7 after irradiation with 2 and 4 Gy, 3D-culture showed elevated percentages of CD44⁺/CD24^{low} cells: CSC fraction in mammospheres were 4.6 ± 0.3 % and 6.1 ± 0.5 %, respectively, and after pretreatment by niclosamide and irradiation the sizes of the CSC fractions were 2.5 ± 0.1 % and 4.0 ± 0.3 %, respectively. Radiosensitizing effect of niclosamide lasted for 2 weeks. At day 14 after irradiation at 2 and 4 Gy in combination with niclosamide the numbers of 3D-culture cells were reduced by 13 % and 9 % compared to cell numbers after irradiation with appropriate doses without of niclosamide. Radiosensitization of cells grown in mammospheres might be related with increase in DNA double-strand breaks (DSB) produced by niclosamide. At 1 h after 2 and 4 Gy irradiation cells grown in mammospheres shown 2.4-fold and 4.8-fold increase in DNA DSB, as indicated by γH2AX levels, compared to baseline. The combined treatment of niclosamide and irradiation with 2 and 4 Gy resulted in 3.4-fold and 5.5-fold increase in the levels of histone γ-H2AX, respectively.

Conclusion: Niclosamide increased the radiosensitivity not only of the bulk cells of mammary adenocarcinoma line MCF-7 but also of CSCs. The radiosensitizing effect of niclosamide was associated with increase in the level of DNA damage.

Key words: niclosamide, γ-radiation, MCF-7 cell line, cancer stem cells, human breast adenocarcinoma, radioresistance, radiosensitization

REFERENCES

- Li F., Tiede B., Massagué J. et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis // *Cell Research*. 2007. Vol. 17. P. 3–14.
- Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. Vol. 100. № 7. P. 3983–3988.
- Visvader J.E., Lindeman G.J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions // *Nat. Rev. Cancer*. 2008. Vol. 8. № 10. P. 755–768.
- Choi C.H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal // *Cancer Cell Int*. 2005. Vol. 5. P. 30–38.
- Krause M., Dubrovskaya A., Linge A. et al. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2017. Vol. 109. P. 63–73.
- Krause M., Yaromina A., Eicheler W. et al. Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy // *Clin. Cancer Res*. 2011. Vol. 17. № 23. P. 7224–7229.
- Bao S., Wu Q., McLendon R.E. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // *Nature*. 2006. Vol. 444. P. 756–760.
- Lagadec C., Vlashi E., Donna L.D. et al. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment // *Breast Cancer Res*. 2010. Vol. 12. №1. P. R13–R20.
- Peitzsch C., Kurth I., Kunz-Schughart L. et al. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance // *Radiother. Oncol*. 2013. Vol. 108. P. 378–387.
- Yang T., Rycak K. Targeted therapy against cancer stem cells // *Oncol. Lett.*, 2015. Vol. 10. № 1. P. 27–33.
- Lamb R., Harrison H., Hult J. et al. Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition // *Oncotarget*. 2014. Vol. 5. № 22. P. 11029–11037.
- You S., Li R., Park D. Disruption of STAT3 by Niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer // *Mol. Cancer Ther*. 2014. Vol. 13. № 3. P. 606–616.
- Dontu G., Abdallah W.M., Foley J.M. et al. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells // *Genes Dev*. 2003. Vol. 17. № 10. P. 1253–1270.
- Wang R., Lv Q., Meng W. et al. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors // *J. Thorac. Dis*. 2014. Vol. 6. № 6. P. 829–837.
- Krutzik P., Nolan G. Intracellular phosphoprotein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events // *Cytometry. Part A*. 2003. Vol. 55A. P. 61–70.
- Phillips T.M., McBride W.H., Pajonk F. The response of CD24^{low}/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation // *J. Natl. Cancer Inst*. 2006. Vol. 98. № 24. P. 1777–1785.
- Wang Y.C., Chao T.K., Chang C.C. et al. Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells // *PLoS One*. 2013. № 8. e74538.
- Khanim F.L., Merrick B.A., Giles H.V. et al. Redeployment-based drug screening identifies the anti-helminthic niclosamide as anti-myeloma therapy that also reduces free light chain production // *Blood Cancer J*. 2011. Vol. 1. № 10. e39.